

**Mikroinjektion prokaryotischer
Erbinformation in den Schimmelpilz
*Neurospora crassa***

Karl Norbert Angerbauer

1977
—

**Mikroinjektion prokaryotischer Erbinformation in
den Schimmelpilz *Neurospora crassa*.**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität, München**

vorgelegt von

Karl Norbert Angerbauer

aus

Augsburg

1976

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
Januar 1973 bis Dezember 1975 am Genetischen
Institut der Universität München unter Anlei-
tung von Professor Dr. W. Klingmüller durchge-
führt.



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klingmüller
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. J. Becker
- Tag der mündlichen Prüfung: 7. März 1977

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1 - 6
MATERIAL UND METHODEN	7 - 36
1. Stämme	7
2. Nährmedien	9
3. Puffer und Lösungen	12
4. Szintillationsflüssigkeit	14
5. Besondere Chemikalien	14
6. Radioaktive Substanzen	15
7. Besondere Materialien	15
8. Herstellen von Bakteriensuspensionen	15
9. Gewinnung von Phagenlysaten	16
10. Anzuchtverfahren für <i>Neurospora crassa</i>	20
11. DNS-Präparationen	22
12. Auswertung der Gradienten	26
13. Transformation eines Tryptophan-auxotrophen E.coli Stammes mit Col E 1-trp-Plasmid-DNS	27
14. Nachweis des Col E 1-trp-Plasmids durch Kreuz- test	28
15. Mikroinjektion	29
16. Auftrennung von Neurosporamyzel in subzelluläre Fraktionen nach Mikroinjektion	33
17. Versuche zur Ausprägung prokaryotischen Erb- materials in Neurosporazellen	33
18. Genetische Analyse von tryp^+ -Isolaten	35
19. Statistische Sicherung	36
ERGEBNISSE	37 - 105
1. Mikroinjektion	37
1.1. Vorbehandlung der Mikroinjektionskanülen	38
1.2. Gewinnung eines zur Mikroinjektion geeigneten Phagenlysats	41
1.3. Nachweis der Infektiosität von λ -Phagen in Form von "plaque forming units" nach Ejektion aus der Mikrokanüle	43
1.4. Mikrokulturen von <i>Neurospora crassa</i> und Mikro- injektionstechnik	44

1.5.	Nachweis von Bakteriophagen im Pilzmyzel nach Mikroinjektion	49
1.6.	Interzelluläre Verteilung von λ -Phagen im Myzel von <i>N.crassa</i> nach Mikroinjektion	60
1.7.	Intrazelluläre Verteilung von λ -Phagen im Myzel von <i>N.crassa</i> nach Mikroinjektion	64
1.8.	Quantitative Abschätzung der mittels Mikroinjektion in Hyphenzellen von <i>N.crassa</i> injizierbaren Phagenlysatsmenge	66
1.9.	Zeitliche Abhängigkeit des Phagennachweises ...	68
1.10.	Phagennachweis in Konidiosporen	68
2.	Phagenwirkung	70
2.1.	Einfluß injizierter Bakteriophagen auf die Keimungsrate von <i>N.crassa</i> -Wildtypkonidien	70
2.2.	Ausprägung bakterieller Erbinformation in <i>N.crassa</i> nach Mikroinjektion von λ -Phagen	72
3.	Versuche mit prokaryotischer DNS	75
3.1.	Inkubation von λ dv-Plasmid-DNS mit Rohextrakt aus <i>N.crassa</i> -Myzel	76
3.2.	Mikroinjektion von λ dv-Plasmid-DNS	82
3.3.	Mikroinjektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS	86
3.4.	Gewinnung prototropher <i>N.crassa</i> -Kolonien nach Mikroinjektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS	89
4.	Charakterisierung der Tryptophan-prototrophen <i>N.crassa</i> -Isolate	91
4.1.	Stabilität der Tryptophan-prototrophen Isolate.	91
4.2.	Prüfung der Tryptophanprototrophie in den vegetativen Subkulturen der stabilen $tryp^+$ -Isolate durch differentielle Plattierung	93
4.3.	Kreuzung der stabilen homokaryotischen $tryp^+$ -Isolate mit auxotrophen $tryp-1$ Mutanten	98
4.4.	Untersuchung kreuzungssteriler, heterokaryotischer $tryp^+$ -Isolate durch Zentrifugation im CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten	101

DISKUSSION 106 - 120

ZUSAMMENFASSUNG 121 - 123

LITERATURVERZEICHNIS 124 - 130

A. EINLEITUNG

Es sind im wesentlichen drei verschiedene Mechanismen bekannt, die einen Austausch genetischer Information zwischen einfach organisierten, kernlosen Lebensformen (Prokaryoten) ermöglichen. Die erste Möglichkeit, die Transformation (Avery et al., 1944), ist die Aufnahme "nackter" Spender-DNS und deren Expression in der Wirtszelle. Ein zweiter Mechanismus ist die Konjugation (Lederberg und Tatum, 1946), wobei spezielle Zellstrukturen für die interzelluläre Übertragung genetischer Information benutzt werden. Bei der Transduktion (Zinder und Lederberg, 1952) - dritte Möglichkeit - übernimmt ein Virus die Vektorfunktion zur Übertragung der Erbinformation auf die neue Wirtszelle.

In den letzten Jahren wurde versucht, ähnliche Mechanismen zur Heilung genetischer Defekte bei höher organisierten, mit einem definierten Zellkern ausgestatteten Lebensformen (Eukaryoten) anzuwenden. Über die Aufnahme prokaryotischer DNS in pflanzliche bzw. tierische Zellen wurde mehrfach berichtet (Review siehe: Merril und Stanbro, 1974). Zudem gibt es Anhaltspunkte für eine Expression dieser DNS in den neuen Wirtszellen (Hess, 1973). Ein der bakteriellen Konjugation entsprechender Mechanismus zur Übertragung genetischer Information auf eukaryotische Zellen ist nicht beschrieben. Vergleichbar wäre etwa die Fusion ganzer Zellen (Review siehe: Cocking, 1975). Dabei können jedoch nur unterschiedliche Mengen genetischer Information in meist niedriger Frequenz von Zelle zu Zelle übertragen werden.

Ein transduktionsähnlicher Vorgang - genannt Transgenosis (Doy et al., 1973) - konnte dagegen erfolgreich zur Genübertragung eingesetzt werden. Die Autoren benutzten dabei nicht-onkogene Viren (Carlson, 1973) bzw. transduzierende Bakteriophagen zur Übertragung spezifischer E.coli-Information auf eukaryotische Zellen. Derartige Experimente erbrachten sowohl hinsichtlich der Korrektur enzymatischer Defekte in menschlichen Gewebekulturen (Merril et al., 1971), als auch bei der phänotypischen Kompensation genetischer Defekte in Pflanzenzellen (Doy et al., 1973; Johnson et al., 1973) positive Ergebnisse.

Dabei hat sich gezeigt, daß für die gewählte "Transportform" der DNS zwei Überlegungen entscheidend sind. Erstens sollte es möglich sein, das spezifische Gen bzw. Operon selektiv anzureichern. Dies spricht für die Wahl von DNS-Formen mit einer möglichst geringen Zahl "unerwünschter" Gene. Zweitens muß die "Überlebenschance" des übertragenen Genmaterials mitberücksichtigt werden. Die Stabilität gegenüber wirtseigenen Nukleasen ist dafür entscheidend.

Die erste Bedingung wird weder durch die Übertragung bakterieller DNS noch durch Protoplastenfusion erfüllt. In beiden Fällen ist die spezifische Gendosis relativ gering, die Zahl nichtspezifischer Gene dagegen beträchtlich. Was die Stabilität der Fremd-DNS betrifft, scheint intrazellulär die Resistenz gegen wirtseigene Exonukleasen entscheidend. Hier dürften ringförmig geschlossene bzw. zum Ringschluß potentiell fähige DNS-Formen stabiler sein als lineare DNS.

Der Einsatz circulärer DNS brächte zudem den Vorteil, daß derartig übertragene Erbinformation als autonom replizierendes Plasmid in der neuen Wirtszelle erhalten bleiben könnte. Damit wäre bezüglich der Funktion die Integration der Fremdinformation in das Wirtsgenom nicht mehr unabdingbare Voraussetzung.

Speziell transduzierende Bakteriophagen wie auch Plasmide entsprechen weitgehend den obengenannten Überlegungen. Für die in der vorliegenden Arbeit unternommenen Versuche zur genetischen Therapie eukaryotischer Empfängerzellen wurden deshalb speziell transduzierende λ -Phagen (λ ptrp; Shimada et al., 1972) bzw. substituierte colicinogene Faktoren (Col E 1-trp; Hershfield et al., 1974) als DNS-Spender gewählt. Mit relativ einfachem technischem Aufwand können λ -Phagen in hoher Konzentration angereichert werden. Dies gilt auch für den colicinogenen Faktor Col E 1. Die Replikation dieses Plasmids ist in einer E.coli Zelle nur nachlässig kontrolliert. Unter dem Einfluß von Chloramphenicol wird die Replikation chromosomaler DNS gehemmt, diejenige des Plasmids jedoch nicht. So können 1000 - 3000 Kopien dieses Plasmids je Zelle erhalten werden. Die Col-Faktor-DNS macht dann bis zu 45 % der Gesamt-DNS der Zellen aus. Die Zahl der "unerwünschten" Gene ist dabei auf ein Minimum reduziert. Zudem ist Col-Faktor-DNS kovalent ringförmig geschlossen. Dieses Potential besitzt auch λ -Phagen DNS.

Als eukaryotischer Empfänger wurde der rote Brotschimmel *Neurospora crassa* gewählt. Der Vorteil gegenüber den in den obengenannten Untersuchungen verwendeten Empfängerzellen

liegt darin, daß dieser Organismus auch genetisch untersucht werden kann. Derartige Untersuchungen sind über eine phänotypische Erkennung von Genexpressionen und deren enzymatischer Analyse hinaus von Bedeutung. Sie ermöglichen Aussagen über den Ort und die Stabilität eines etwaigen Einbaus exogener Information im Verlauf rekombinatorischer Prozesse (Teifel, 1976). Hinsichtlich eines eventuellen späteren praktischen Einsatzes von Experimenten zur Gentherapie sind derartige Informationen unerlässlich.

Zur Applikation der prokaryotischen Erbinformation wurde die Technik der Mikroinjektion gewählt. Im Gegensatz zu der ungesteuerten, passiven Aufnahme prokaryotischer Erbinformation in den vielfach angewandten Inkubationsverfahren (Szabo und Schablik, 1973; Teifel, 1976), ermöglicht diese Methode eine aktive Übertragung der Fremdinformation auf die eukaryotischen Empfängerzellen. Der entscheidende Vorteil liegt darin, daß extrazelluläre Veränderungen des zu übertragenden Genmaterials, wie z. B. Nukleaseangriffe im Inkubationsmedium, ausgeschlossen werden können.

Die Mikroinjektionstechnik wurde von Wilson (1961) erstmals für Untersuchungen am Schimmelpilz *Neurospora crassa* angewandt. Die Experimente galten der Übertragung bestimmter Zellorganellen von einer *Neurosporamutante* auf eine andere. Der Autor verwendete dabei Mikrokanülen mit einem Spitzendurchmesser von ca. 3 - 5 μm . In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diese Methode technisch so zu verfeinern, daß Mikroinjektionskanülen mit einem maximalen Spitzendurchmesser von 1 μm eingesetzt werden konnten. Dadurch sollte

eine möglichst schonende Behandlung der punktierten Pilzzellen erreicht werden, um das Auslaufen des Zellplasmas nach beendeter Injektion weitgehend zu reduzieren. In Zusammenhang damit waren in einem ersten Hauptteil dieser Arbeit zahlreiche technische Probleme zu lösen.

In einem zweiten Hauptteil sollte geprüft werden, ob Stoffwechseldefekte in *Neurospora crassa* durch Übertragung der entsprechenden bakteriellen Gene korrigiert werden können. Dazu wurden Tryptophan-auxotrophe Stämme mit λ trp-Phagen bzw. Col E 1-trp-Plasmid-DNS injiziert. Die applizierte Fremdinformation enthielt das gesamte trp-Operon von *E.coli*. Als Empfänger wurden Hyphenzellen der *Neurosporamutante* tryp-1 (Kopplungsgruppe III) verwendet. Das Genprodukt des tryp-1 Locus ist Komponente eines Multienzymkomplexes, der drei verschiedene Reaktionsschritte bei der Bildung von Tryptophan aus Chorisminsäure katalysiert (Hütter und De Moss, 1967; Ahmad et al., 1964; Gaertner und De Moss, 1969; Arroyo-Begovich und De Moss, 1973). Für die entsprechenden Syntheseschritte sind bei *E.coli* die Produkte der Gene E, D und C des insgesamt fünf Gene umfassenden trp-Operons (trp E - trp A) notwendig. Eine Expression der genannten Gene wäre Voraussetzung für eine erfolgreiche genetische Heilung der *Neurosporamutanten*. Als Kriterium dafür galt das Auftreten Tryptophan-prototropher Nachkommenzellen, die durch Plattierung auf Selektivmedium ermittelt werden.

Im dritten Hauptteil der vorliegenden Arbeit sollte schließlich die Stabilität der erhaltenen Tryptophan-prototrophen

Isolate durch differentielle Plattierung und genetische Analyse näher untersucht werden. Regelmäßige Aufspaltung (4:4) bzw. aberrante Transmission des tryp^+ -Markers nach Kreuzung der prototrophen Isolate mit den auxotrophen Ausgangsstämmen würde Aussagen über eine Integration bzw. eine Adhäsion (Exosom) der tryp^+ Information im Neurospora-genom erlauben. Weiterhin könnte eine extrachromosomale Vererbung des prototrophiebedingenden Markers durch reziproke Kreuzung mit der tryp-1 Mutante erkannt werden. Radioaktive Markierung der Gesamt-DNS der tryp^+ -Isolate und Zentrifugation im CsCl -Ethidiumbromid Dichtegradienten dürften für eine dies-bezügliche Charakterisierung ebenfalls nützlich sein.

B. MATERIAL und METHODEN

1. Stämme:

1.1. Bakteriophagen:

λ -Wildtyp: Herkunft: K. Krell, Department of Health,
Education and Welfare; Rockville, Maryland
20852, U.S.A.

Transduzierende Phagen: λ ptrp, plaquebildend, enthält
trp-Operon von E.coli;
Herkunft: K. Shimada, Department of Biochemistry,
Kyushu University, School of Medicine; Higashi-hu,
Fukuoka 812, Japan.

λ plac, plaquebildend, enthält lac-Operon von E.coli;
Herkunft: P. Gresshoff, Department of Genetics,
Research School of Biological Sciences,
Australian National University; Canberra A.C.T.,
Australia.

ϕ 80- λ dhis, nicht plaquebildender Hybrid-Phage, enthält
his-Operon von Salmonella, Prophage in E.coli
SB 2331, bedarf zur Lyse eines plaquebildenden
Helferphagens.
Herkunft: R. Martin, Laboratories of Molecular
Biology, N.I.H.; Bethesda, Maryland 20014,
U.S.A.

1.2. Plasmid-DNS:

^3H - λ dv (Trimer MG ca. $6,3 \times 10^6$ D und Monomer MG ca.
 $2,1 \times 10^6$ D)
Herkunft: G. Hobom, Institut für Biologie III,
Universität Freiburg/Breisgau.

1.3. Escherichia coli:

C 600 (λ^S , sup E⁺, leu⁻, T⁻, B₁⁻)

Herkunft: K. Krell (vgl. 1.1.)

KS 110, W 3623 (gal⁻, trp⁻, str^r);

KS 805 (trp R⁻, trp A 9761, trp E 9828);

Herkunft: K. Shimada (vgl. 1.1.)

SB 2331 (pro⁻, B₁⁻), lysogen für Ø 80- λ -Hybridphagen
und Ø 80- λ dhis-Hybridphagen (c_I857);

SB 1490 (his⁻), lysogen für Ø 80;

N 99 (su III⁻);

Herkunft: Janice Yang Chou, Laboratories
of Molecular Biology, N.I.H.; Bethesda,
Maryland 20014, U.S.A.

W 3110 (F⁻, thy A 36⁻, λ^- , Col E 1⁺)

Herkunft: D. Thomas; Genetisches Institut,
Universität München.

JMB 9 (C 600 T⁻, leu⁻ B₁⁻; gal 1, a⁻; F⁻, lac⁻, xyl⁻,
ara⁻, str^s) rec A⁻, trp E 5/pVH 5 (Col E 1-trp)

Herkunft: C. Yanofsky; Department of Biological
Sciences, Stanford University, California.

BHB 960 (ton B su III⁺)

Herkunft: Th. Hohn, Biozentrum, Abt. f.
Mikrobiologie, Basel, Schweiz.

1.4. Neurospora crassa:

Wildtyp 74-OR 23-1A de Serres:

Herkunft: Mary E. Case, Yale University, U.S.A.

Wildtyp 74-OR 8-1a; auxotrophe Mutanten:

tryp-1, a, FGSC 1066;

tryp-2, A, FGSC 990; tryp-3, C 83, A, FGSC 862.

Herkunft: Fungal Genetics Stock Center;

Arcata, California 95521, U.S.A.

tryp-1, his 1, A

Herkunft: J. Teifel, Genetisches Institut,
Universität München.

ed^r-29, A (ed^r, pan-2, ylo-1, tryp-2)

Herkunft: M.L. Teles Grilo, Genetisches
Institut, Universität München.

nuc-1, nuc-2, double

Herkunft: T. Ishikawa, Inst. of Applied
Microbiology, University of Tokyo, Bunkyo-Ku,
Tokyo, Japan.

2. Nährmedien:

2.1. Bakterien:

2.1.1. Luria-Broth (LB):

5g Yeast-Extract, 10g Trypton, 0,5g NaCl, 5g Glukose,
15g Bacto-Agar, 1mM CaCl₂, 11 H₂O.

2.1.2. Trypton-Broth (TB):

In 100ml H₂O werden gelöst: 1g Trypton, 0,5g NaCl.

2.1.3. Trypton-Soft-Agar:

Wie 2.1.2., Zugabe von 0,55g Difco-Bacto-Agar.

2.1.4. TB-Platten:

Wie 2.1.2., Zugabe von 1,1g Difco-Bacto-Agar und
Thiamin · HCl, Endkonz. 5×10^{-5} %.

2.1.5. TBMM für Übernachtskulturen (ÜK):

Wie 2.1.2., Zugabe von MgSO₄ · 7 H₂O, Endkonz. 10^{-2} M;
Maltose, Endkonz. 0,2 % und Thiamin · HCl, Endkonz.
 5×10^{-5} %.

2.1.6. TBMM für Exponentialkulturen (EK):

Wie 2.1.5., aber MgSO₄ · 7 H₂O, Endkonz. 10^{-3} M.

2.1.7. Rich-Plates:

wie 2.1.4.; Zugabe von $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Endkonz. 10^{-2}M .

2.1.8. M-9 enriched:

In 1l H_2O werden gelöst: 7g Na_2HPO_4 , 3g KH_2PO_4 ;
0,5g NaCl ; 1g NH_4Cl ; 0,25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01g CaCl_2 ;
10g Casamino Acids; 4g Glukose und Thiamin $\cdot \text{HCl}$,
Endkonz. $5 \times 10^{-5} \%$.

2.1.9. M-56 (2x):

8,7g Na_2HPO_4 ; 5,4g K_2HPO_4 ; 2g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2ml einer
10%igen $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung; 1ml einer 1%igen $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -
Lösung; 1 ml einer 0,05%igen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung;
1l H_2O .

2.1.10. Minimalagar:

400ml M-56 (2x), 400ml 3%iger Wasseragar;
1ml einer 0,5%igen Thiamin $\cdot \text{HCl}$ -Lösung;
15ml einer 20%igen Glukose-Lösung;
2ml einer 1%igen TTC-Lösung.

2.1.11. Wasseragar:

6g Difco-Bacto-Agar in 1l H_2O .

2.1.12. Nutrient Broth (NB):

In 1l H_2O werden gelöst: 8g Difco Nutrient Broth;
5g NaCl .

2.1.13. Enriched Nutrient Broth (ENB):

Zusätzlich zu 2.1.12.: 5g Bacto-Pepton;
3,5g Na_2HPO_4 ; 1,5g KH_2PO_4 ; 1g Glukose;
250mg Thiamin $\cdot \text{HCl}$.

2.2. Neurospora

2.2.1. Vogels Minimalmedium (50x):

In 750ml H₂O werden gelöst:

150g Na₃-Citrat·5,5 H₂O; 250g KH₂PO₄;

100g NH₄NO₃; 10g MgSO₄·7H₂O; 5g CaCl₂·2H₂O;

Spurenelemente und Biotin (nach Vogel, 1956).

2.2.2. Fries Minimalmedium (4x):

In 1l H₂O werden gelöst: 20g NH₄-Tartrat;

4g NH₄NO₃; 4g KH₂PO₄; 2g MgSO₄·7H₂O;

0,4g NaCl; 0,56g CaCl₂·2H₂O;

Spurenelemente und Biotin (nach Beadle and Tatum, 1941).

2.2.3. Westergaard Kreuzungsmedium

In 1l H₂O werden gelöst: 1g KNO₃; 1g KH₂PO₄;

1g MgSO₄·7H₂O; 0,1g NaCl; 0,1g CaCl₂; 10g Glukose;

15g Difco-Bacto-Agar; Spurenelemente und Biotin

(nach Westergaard und Mitchell, 1947).

2.2.4. Glycerol Complete Medium:

20ml Vogels Minimal; 10ml Glycerin;

10ml Vitaminlösung; 2,5g Yeast Extract;

1g Casamino Acids; 15g Difco-Bacto-Agar;

980ml H₂O (nach Horowitz, 1947).

2.2.5. Neurospora Culture Agar:

1l H₂O; 65g Difco-Bacto-Neurospora-Culture-Agar.

2.2.6. GFS Minimalmedium:

20ml Vogels Minimal (50x); 10g Sorbose;
0,5g Fructose; 0,5g Glucose;
15g Difco-Bacto-Agar; 980ml H₂O.

2.2.7. Sucrose Minimalmedium:

20ml Vogels Minimal (50x); 15g Sucrose;
980ml H₂O; bei festem Medium zusätzlich
15g Difco-Bacto-Agar.

2.3. Supplementierung:

Bei Bedarf wurden die Nährmedien mit
50 µg Tryptophan/ml, 100 µg Histidin bzw.
Panthotensäure/ml supplementiert.

3. Puffer und Lösungen:

3.1. Tris-HCl-Puffer:

Tris (hydroxymethyl) aminomethan (=Tris)
1M; 0,25M; 0,1M; 0,01M und 0,05M;
pH 8,0. 0,05M, pH 7,4; 0,1M, pH 7,4;
Einstellen des pH mit 1n HCl.

3.2. TE-Puffer:

0,01M Tris-HCl, pH 8,0; 0,001M EDTA.

3.3. TMG-Puffer:

In 1l H₂O werden gelöst: 6g Tris;
2,46g MgSO₄·7H₂O; 0,1g Gelatine;
Einstellen von pH 7,4 mit 1n HCl.

3.4. TM-Puffer:

Wie 3.3.; jedoch ohne Gelatine.

3.5. Standard-Saline-Citrat (=SSC) (1x):

0,15M NaCl; 0,015M $\text{Na}_3\text{-Citrat}$;

Einstellen von pH 7,0 mit 1n NaOH.

3.6. Saline:

0,95g NaCl; in 99ml H_2O lösen.

3.7. Saline-EDTA:

In 1l H_2O werden gelöst: 8,75g NaCl und 37,2g EDTA.

3.8. Sorbitolpuffer:

1,3M Sorbitol; 0,02M Tris; 0,02M Maleat; 0,002M EDTA;

Einstellen von pH 5,7 mit 1n NaOH bzw. 1n HCl.

3.9. Acetat-EDTA:

40,8g Na-Acetat; 0,037g EDTA; in 100ml H_2O lösen.

3.10. Phosphat-Citrat-Puffer:

0,075M $\text{Na}_3\text{-Citrat}$; 0,075M K_2HPO_4 ; pH 6,8.

3.11. TES-Puffer:

0,03M Tris; 0,05M EDTA; 0,02M NaCl; pH 8,0.

3.12. TEN-Puffer:

0,02M Tris; 0,001M EDTA; 0,02M NaCl; pH 8,0.

3.13. Hyperosmolare Vogels Minimal Lösung:

Zu 78ml H_2O werden 22ml Vogels Minimalmedium (50x)

(vgl. 2.2.1.) zugegeben.

3.14. 3,2 % SDS Lytic-Mix:

10ml einer 20%igen SDS-Lösung in 0,01M Tris-HCl,
pH 8,0; 5ml 1M Na₂EDTA-Lsg., pH 8,0;
5ml 1M Tris-HCl-Lsg., pH 8,0; 80ml H₂O.

3.15. Detergens-Mix zur Gewinnung von N.crassa-DNS:

0,01M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0; 2% Sarcosyl NL 30;
3% Na-Deoxycholat; 5% SDS; gelöst in 0,02M EDTA-Lösung.

4. Szintillationsflüssigkeit:

5g PPO; 0,3g POPOP; gelöst in 1l Toluol.
Für wässrige Lösungen wurde ein Gemisch aus
Toluol-Szintillator(7,5ml) und Triton-X100 (3,5ml)
verwendet.

5. Besondere Chemikalien:

RNase A, Ethidiumbromid, Lysozym, Desoxyadenosin-H₂O,
Polyäthylenglycol (=PEG) Typ 6000, Chloramphenicol,
Cysteamin-HCl, Thiamin-HCl, Thymidin-5-Phosphat-
Dinatrium-Salz (=TMP), Dodecylsulfat-Na-Salz (=SDS),
Triphenyl-tetrazoliumchlorid (=TTC), Triton-X100,
Tween 40 bzw. 80 von Serva, Heidelberg.
Helicase (suc helix pomatia) von l'industrie biologique
Francaise.
ß-Glucuronidase/Arylsulfatase, Pronase von Boehringer,
Mannheim.
Siliconöl AK 100 und AK 350 von Wacker Chemie,
Burghausen.
Sarcosyl NL 30 von Ciba Geigy, Basel, Schweiz.
DEAE-Dextran von Pharmacia Fine Chemicals AB,
Uppsala, Schweden.

Pimafulcin (1%ige Lösung) von Basotherm GmbH,
Biberach/Riss.

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Yeast Extract,
Neurospora Culture Agar, von Difco Laboratories,
Detroit, Michigan, U.S.A.

Serum-Albumin vom Rind (BSA) von Behring Werke AG,
Marburg/Lahn.

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von
Merck, Darmstadt bezogen.

6. Radioaktive Substanzen:

(methyl³H) Thymidine; Spez. Aktivität 56 Ci/mmol,
1,0 mCi/ml;

(U-¹⁴C) Uridine; Spez. Aktivität 524 mCi/mmol,
50 Ci/ml;

von The Radiochemical Centre, Amersham, England.

7. Besondere Materialien:

Glasfaserfilter (Ø 21mm) von Schleicher und Schüll,
München; Dialyseschläuche von Union Carbide Corporation,
Chicago, Illinois, U.S.A.

Cellophanfolie (Typ P 650) von Kalle AG, Wiesbaden.

8. Herstellen von Bakteriensuspensionen:

8.1. Gewinnung von Bakterieneinzelkolonien:

Mit einer sterilen Impföse wurden aus einem Stamm-
röhrchen Bakterien entnommen, in Saline verdünnt, die
Suspension auf eine TB-Platte ausgestrichen und über
Nacht bei 34° C bebrütet.

8.2. Herstellung einer Bakterienübernachtskultur (ÜK):

Entsprechend supplementiertes M-9 enriched, Luria Broth-bzw. TBMM-ÜK-Medium wurde mit einer Bakterieneinzelkolonie beimpft und über Nacht bei 34° C belüftet (Bakterienendkonz. ca. 2×10^9 Zellen/ml).

8.3. Aufbewahrung einer ÜK:

Die nach 8.2. erstellte ÜK wurde bei 9000 rpm 10 Min. im SS 34 Rotor abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 0,01M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ suspendiert und bei 4° C aufbewahrt.

9. Gewinnung von Phagenlysaten:

9.1. Gewinnung von ϕ 80-like Hybridphagen:

Eine nach 8.2. erstellte ÜK des Bakterienstammes SB 2331 wurde 1:100 in TBMM-EK-Medium + 100µg Prolin/ml verdünnt und unter Schütteln (150rpm) bei 34° C bis zu einer Konzentration von 3×10^8 Zellen/ml kultiviert. Nach Erreichen dieser Konzentration ($E_{650} = 0,5$ im Beckman Photospektrometer) wurde die Bakteriensuspension in ein Wasserbad von 41° C übergeführt (Prophageninduktion), dort 45 Min. bei 250 rpm geschüttelt, weitere 45 Min. bei 34° C nachbebrütet und anschließend 10 Min. bei 9000 rpm, 2° C, im SS 34 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand (Phagenrohlysat, Gemisch aus his-Phagen und Helferphagen) mit $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bis zu einer Endkonz. von 0,01M versetzt und bei 4° C aufbewahrt.

9.2. Gewinnung von λ ptrp-Phagen

9.2.1. Plattenvermehrung:

0,1ml Bakteriensuspension (vgl. 8.3.) des E.coli-Stammes C 600 wurden mit 0,1ml λ ptrp-Phagen (Konz. ca. 3×10^5 /ml) vermischt, 10 Min. bei 34° C inkubiert (Phagenadsorption) und mit 2,5ml Soft Agar + 3ml Trypton-Broth auf Rich-Plates ausgegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 41° C bebrütet, der Plattenüberstand geerntet und 2x15 Min. bei 9000rpm, 2° C, im SS 34 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand mit $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Endkonz. 0,01M) versetzt und bei 4° C aufbewahrt.

9.2.2. Flüssigvermehrung:

9.2.2.1. Unmarkierte λ ptrp-Phagen:

Eine nach 8.2. erstellte ÜK des Bakterienstammes C 600 wurde 1:100 in M-9 enriched + 100 μg Leucin/ml verdünnt und unter Schütteln (150 rpm) bei 34° C bis zu einer Konzentration von 3×10^8 /ml angezüchtet. Die Bakterien wurden 10 Min. bei 5000rpm im SS 34 Rotor abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet im gleichen Volumen TM-Puffer resuspendiert und nochmals 10 Min. bei 5000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit λ ptrp-Phagen (Multiplizität 4) in $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Endkonz. 0,01M) versetzt und 10 Min. bei 34° C inkubiert. Anschließend wurde M-9 enriched + 100 μg Leucin/ml (vorgewärmt auf 41° C) bis zum Ausgangsvolumen zugegeben und die Suspension 2 Std. bei 41° C, 250rpm, geschüttelt. Die Zellfragmente

der Bakterien wurden bei 9000rpm, 2° C, 10 Min. im SS 34 Rotor abzentrifugiert, der Überstand (Phagenrohlysat) mit $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Endkonz. 0,01M) versetzt und bei 4° C aufbewahrt.

9.2.2.2. ^3H -markierte λ ptrp-Phagen:

Wie 9.2.2.1. Das vorgewärmte M-9 enriched Medium wurde außer mit 100µg Leucin/ml noch mit (Methyl- ^3H)-Thyminidin (Endkonzentration 2µCi/ml) und 250µg Desoxyadenosin/ml versetzt.

9.3. Anreicherung und Reinigung der Phagen:

100ml Phagenrohlysat wurden mit 10g PEG verrührt und 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden 8ml 5M NaCl-Lösung zugegeben und weitere 30 Min. inkubiert. Das Gemisch wurde 15 Min. bei 11000rpm, 2° C, im SS 34 Rotor zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet (an PEG adsorbierte Phagen) in 10ml TMG-Puffer gelöst und auf einen CsCl-Stufengradienten geschichtet. Der CsCl-Stufengradient wurde folgendermaßen hergestellt:

In ein 30ml Cellulose-Nitrat-Röhrchen (Beckman) wurden 6ml CsCl-Lösung ($\rho = 1,6\text{g cm}^{-3}$) pipettiert und mit 12ml CsCl-Lösung ($\rho = 1,4\text{g cm}^{-3}$) überschichtet. Die Dichten wurden im Refraktometer (Vinograd, 1963) bestimmt. Auf den Stufengradienten wurden 10ml Phagenlysat gebracht und der Gradient 90 Min. bei 23000rpm, 8° C, im SW 25 Rotor zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation sind die Phagen aufgrund ihrer Dichte von $1,5\text{g cm}^{-3}$ an der Grenzschicht zwischen den beiden CsCl-Lösungen als helle Bande erkennbar. Der Boden des

Röhrchens wurde mit einer Kanüle durchbohrt, diese zur Phagenbande vorgeschoben und die Phagen abgezapft. Zur Entfernung von CsCl wurde über Nacht gegen 1l TMG-Puffer bzw. Phosphat-Citrat-Puffer bei 4° C dialysiert.

9.4. Titration der Phagen:

Phagenlysate wurde schrittweise in TMG-Puffer verdünnt. Von den in Frage kommenden Verdünnungen wurden 0,1ml mit 0,1ml Bakteriensuspension (N 99 für ϕ 80- λ dhis/ Helferphagen-Gemisch, C 600 für λ ptrp) vermischt, 10 Min. bei 34° C inkubiert (Phagenadsorption) und mit 2,5ml Soft-Agar auf TB-Platten ausgegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 41° C bebrütet.

9.5. Transduktionstest:

9.5.1. Qualitativ:

0,1ml Bakteriensuspension (SB 1490 für ϕ 80- λ dhis/ Helferphagen-Gemisch, KS 110 bzw. KS 805 für λ ptrp) wurden mit 2,5ml Wasser-Agar auf eine Minimalplatte ausgegossen. Nach Erstarren der Wasser-Agar-Schicht wurde unverdünntes Phagenlysate, sowie Verdünnungen davon an verschiedenen Punkten auf die Platte aufgetropft und diese 2-3 Tage bei 34° C bebrütet.

9.5.2. Quantitativ:

Vgl. 9.4.; an Stelle von Soft Agar wurde Wasseragar, an Stelle von TB-Platten Minimalplatten verwendet. Als Bakterienempfängerstämme dienten die unter 9.5.1. erwähnten. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 34° C bebrütet.

Um Revertanten zu erkennen wurden Kontrollplattierungen mit TMG-Puffer an Stelle von Phagenlysate durchgeführt.

9.5.3. Ermittlung der Transduktionsrate:

Die Transduktionsrate wurde durch Dividieren der nach 9.5.2. ermittelten Werte mit den entsprechenden nach 9.4. ermittelten errechnet.

9.6. Einzel-Plaque-Vermehrung

Um bei den entsprechenden Experimenten Phagenlysate mit möglichst hoher Transduktionsrate einsetzen zu können, wurden mit sterilen Pasteurpipetten jeweils mehrere Einzelplaques aus Titrationsplatten (vgl. 9.4.) ausgestochen und gemäß 9.2.1. getrennt vermehrt. Die so erhaltenen Rohlysate wurden nach 9.5.2. auf ihre Transduktionsrate getestet. Im weiteren wurden nur die Lysate verwendet, die die höchsten Transduktionsraten aufwiesen.

9.7. Sterilfiltration von Phagenlysaten

Gemäß 9.3. erstellte Phagenlysate wurden vor ihrer Verwendung für Mikroinjektionsversuche sterilfiltriert. Dazu wurde das jeweilige Lysat mittels einer Einmalspritze durch eine Millex-Filterereinheit (Porengröße 0,45 µm; Millipore) gepreßt, deren Filter zuvor mit steriler 0,5M NaCl-Lsg. durchgespült war.

10. Anzuchtverfahren für Neurospora crassa:

10.1. Gewinnung von Konidien:

Erlenmeyer-Weithalskolben (300ml, Schaumstoffkappenverschluß) mit je 50ml Glycerol Complete Medium wurden

mit Konidien inokuliert und 7 Tage bei 25° C bebrütet (Standardkulturen).

10.2. Herstellung von Konidiensuspensionen:

Konidien der Standardkulturen wurden als Staub trocken geerntet, in H₂O suspendiert und zur Entfernung von Myzel durch sterile Watte filtriert. Die Bestimmung der Konidiendichte erfolgte im Coulter Counter (Modell FN; 70 Micron Kapillare).

10.3. Plattierung von Konidien:

Konidien in geeigneter Anzahl wurden mit 100ml geschmolzenem GFS Minimalmedium gut durchgemischt und auf 5 Petrischalen ausplattiert. Nach dreitägiger Bebrütung bei 25° C wurden die makroskopisch sichtbaren Einzelkolonien ausgezählt und bei Bedarf abisoliert.

10.4. Auxotrophie-Test:

Konidienstaub von gemäß 10.3. abisolierten Kolonien wurde in Röhrchen mit flüssigem Sucrose Minimalmedium, je nach Bedarf supplementiert mit a) Tryptophan, b) Histidin bzw. Panthotensäure und c) Tryptophan + Histidin bzw. Panthotensäure abgeimpft. Doppelmutanten wuchsen nur auf c). Einzelmutanten wurden parallel zu a) auf nicht supplementiertes Medium abgeimpft. Sie wuchsen nur auf a).

10.5. Ankeimung von Konidien:

4x10⁶ Konidien/ml wurden in 1x Fries Minimalmedium mit 1% Glucose suspendiert, bei Bedarf entsprechend supplementiert und 24 Std. bei 25° C belüftet.

10.6. Gewinnung von Myzel-Rohextrakt:

Gemäß 10.5. erhaltenes Pilzmyzel wurde über eine Nutsche abfiltriert und gewogen (Naßgewicht). Je 3g Naßgewicht wurden in 20ml Tris-EDTA-Puffer pH 8,0 aufgenommen. Anschließend wurde in einem Küchenmixer 1 Min. zerkleinert. Je 10ml des so erhaltenen Myzelbreies wurden mit 10ml Glasperlen ($\varnothing = 0,5\text{mm}$) in einen gekühlten 100ml Aufschlußbecher des Merkenschlager Homogenisiergerätes gegeben. Unter Kühlung mit flüssigem CO_2 wurde dann 50Sek. bei maximaler Schüttelgeschwindigkeit homogenisiert. Der Überstand wurde dekantiert und bei 150.000g , 0°C , 60 Min. im Ti60-Rotor zentrifugiert. Der partikelfreie Überstand wurde dekantiert und ist im folgenden als Rohextrakt bezeichnet (nach Brass, 1976).

11. DNS-Präparationen:

11.1. Gewinnung von ColE 1- und ColE 1-trp-Plasmid-DNS:

Eine gemäß 8.2. in ENB-Medium (vgl. 2.1.13.) angezogene ÜK von E.coli W 3110 (ColE 1) bzw. JMB 9 (ColE 1-trp) wurde 1:100 in demselben Medium verdünnt und unter Schütteln (150rpm) bei 30°C bis zu einer Konzentration von 3×10^8 Zellen/ml kultiviert. Nach Zugabe von $100\mu\text{g}$ Chloramphenicol/ml wurde unter gleichen Bedingungen weitere 20 Std. geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 10.000rpm, 2°C , 20 Min. abzentrifugiert. Für je 30ml der EK wurde dann folgendermaßen weiter verfahren: Die pelletierten Zellen wurden in 1ml 25%iger Sucrose-lösung (in 0,25M Tris; pH 8,0) im Eisbad resuspendiert.

Nach Zugabe von 0,2ml Lysozym (5mg/ml gelöst in 0,25M Tris; pH 8,0) wurden sie weitere 10 Min. auf Eis gehalten. Dann wurden 0,4ml 0,25M Na₂-EDTA-Lösung (pH 8,0) hinzugefügt und nochmal 10 Min. auf Eis stehen gelassen. Nach Zugabe von 1,6ml Lytic-Mix (vgl. 3.14.) wurde die Lösung bis zum Klarwerden bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wurde bei 30.000rpm, 2° C, 30 Min. im Ti60-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNS enthält, wurde dekantiert und im CsCl-Ethidiumbromid (EtBr)-Gradienten weiter gereinigt (vgl. 11.7.2.).

11.2. Gewinnung ³H-markierter Cole 1-trp-Plasmid-DNS:

Wie 11.1.; zusätzlich wurde 2 Std. nach Chloramphenicol-zugabe 10⁻³mCi ³H-Thymidin zugegeben.

11.3. Gewinnung ³H-markierter λptp-DNS:

Frisch destilliertes, flüssiges Phenol wurde im Verhältnis 1:2 (v:v) mit Tris-HCl-Puffer pH 7,4 vermischt und 5 Min. bei 5000rpm, 20° C, im SS 34 Rotor zentrifugiert (Phasentrennung). Die obere Phase wurde verworfen, die untere (puffergesättigtes Phenol) 1:1 (v:v) mit nach 9.2.2.2. und 9.3. hergestelltem, gereinigtem Phagenlysat versetzt und 20 Min. bei Zimmertemperatur in einem Schraubröhrchen langsam gerollt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch kurzzeitig in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere Phase, welche die DNS enthält, wurde vorsichtig abpipettiert, nochmals mit dem gleichen Volumen puffergesättigtem Phenol vermischt, 20 Min. gerollt und

zentrifugiert. Die obere Phase wurde danach in einen Dialyseschlauch gefüllt und zur Entfernung von Phenol 3 x 12 Std. bei 4° C gegen jeweils 11 1M SSC-Puffer dialysiert.

11.4. Gewinnung ¹⁴C-markierter Neurospora-DNS:

Konidien wurden gemäß 10.5. unter Zusatz von ¹⁴C-Uridin (Endkonz. 10⁻⁴ mCi/ml) angekeimt. Nach 24 Std. wurde das Myzel abgenutscht, 2x mit 100ml H₂O gewaschen und gewogen. Pro 1g Naßgewicht wurden 2ml 0,05M Tris·HCl-Puffer (pH 8,0) und 10mg Cysteamin·HCl zugegeben und 15 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Myzel wurde anschließend 5 Min. bei 7000rpm im SS 34 Rotor abzentrifugiert und 1x mit Sorbitolpuffer gewaschen. Es folgte die Protoplastierung der Zellen durch 90 Min. Inkubation mit 0,2ml Glucuronidase + 1,8ml Sorbitolpuffer bei 25° C. Die Protoplasten wurden 5 Min. bei 7000rpm, 0° C, abzentrifugiert, 1x mit eiskaltem Sorbitolpuffer gewaschen und durch Zugabe von 2ml Detergens-Mix (vgl. 3.15.) + 1ml 2,5%iges Triton-X100 + 1ml 0,25M EDTA-Lösung, pH 8,0, (15 Min. bei 37° C, gelegentliches Schütteln) lysiert. Nach 15 Min. Zentrifugation bei 7000rpm, 0° C, wurde der DNS-haltige Überstand in einen Dialyseschlauch gefüllt und über Nacht bei 4° C gegen 11 SSC-Puffer dialysiert (weitere Reinigung vgl. 11.7.3. und 12.b)).

11.5. Bestimmung des Reinheitsgrades der DNS-Präparationen:

Die Reinheitsprüfung erfolgte im Beckman Photospektrometer mit Hilfe des Quotienten E_{260}/E_{280} .

11.6. Konzentrationsbestimmung der DNS-Präparationen:

Die Konzentration der DNS wurde im Beckman Photospektrometer durch Messen der Extinktion bei 260nm ermittelt, wobei ein Wert von 0,02 μg DNS/ml entspricht.

11.7. Zentrifugation der DNS im neutralen CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten

11.7.1. λ dv-Plasmid-DNS:

5ml TE-Puffer (vgl. 3.2.) und 20 μ l bzw. 50 μ l λ dv-DNS wurden in ein 10ml Cellulose-Nitrat-Röhrchen (Beckman) eingefüllt. Nach Zugabe von 100 μg EtBr/ml und festem CsCl bis zur Dichte 1,57 gcm^{-3} wurde bei 38.000rpm, 15° C, 48 Std. im Ti 50-Rotor zentrifugiert. Das Restvolumen des Zentrifugenröhrchens war mit Paraffinöl aufgefüllt.

11.7.2. ColE 1 - bzw. ColE 1-trp-Plasmid-DNS:

Zu 5ml des gemäß 11.1. erhaltenen, Plasmid-DNS-haltigen Überstandes wurden 100 μg EtBr/ml und festes CsCl bis zur Dichte 1,6 gcm^{-3} zugegeben. Anschließend wurde entsprechend 11.7.1. zentrifugiert.

11.7.3. Neurospora-DNS:

Gemäß 11.4. erstellte, ^{14}C markierte Neurospora-DNS wurde entsprechend 11.7.2. behandelt und zentrifugiert.

11.8. Zentrifugation der λ ptrp-DNS im neutralen CsCl Dichtegradienten:

Die gemäß 11.3. dialysierte ^3H - λ ptrp-DNS wurde durch Zugabe von festem CsCl auf die Dichte 1,71 gcm^{-3} eingestellt. Im Bedarfsfall wurde der Gradient mit SSC-Puffer auf 5ml aufgefüllt. Anschließend wurde nach den in 11.7.1.

angegebenen Bedingungen zentrifugiert.

12. Auswertung der Gradienten

Nach beendeter Zentrifugation wurden die Zentrifugenröhrchen am Boden mit einer Kanüle angestochen.

- a) Die Gradienten 11.7.1., und die radioaktiv markierten Gradienten aus 11.7.2. wurden in Fraktionen von jeweils 5 Tropfen auf Glasfaserfilter aufgebracht und die Filter 30 Min. im Eisbad mit 10%iger TCA-Lösung (Fällung der DNS) sowie jeweils 10 Min. mit 1%iger TCA-Lösung und Äthanol (Entfernung der Nucleotide) behandelt.
- b) Die Gradienten 11.7.3. wurden in Fraktionen von jeweils 5 Tropfen in Wassermannröhrchen ausgetropft und zur Hydrolyse von RNS über Nacht mit dem gleichen Volumen in NaOH bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200µg BSA/ml zugegeben und zur Fällung der DNS 30 Min. im Eisbad mit dem gleichen Volumen 20%iger TCA-Lösung inkubiert. Der Inhalt der Röhrchen wurde auf Glasfaserfilter abgenutscht und die Filter zur Entfernung von Nucleotiden mit 10ml eiskalter 1%iger TCA-Lösung und Äthanol gewaschen.
- c) Mit den Gradienten 11.8. wurde, mit Ausnahme der Hydrolysebehandlung, wie in 12.b) beschrieben verfahren. Es wurden jeweils nur 50µl/Fraktion auf Glasfaserfilter abpipettiert. Diejenigen Fraktionen, welche die DNS-Bande enthielten, wurden gesammelt und bei 4° C, 24 Std. gegen 3x1l 0,1x SSC Puffer dialysiert

Die Filter wurden ca. 1 Std. bei 60° C getrocknet, in Gläschen mit 10ml Scintillationsflüssigkeit (vgl. B.4.) übergeführt und die Radioaktivität im Packard Liquid Scintillation Spektrometer (3003 Tricarb) gemessen.

d) Aus nicht radioaktiv markierten Gradienten 11.7.2.

wurde unter Sichtbarmachung der DNS-Banden im UV-Licht die Bande der dichteren ccc-DNS direkt mit einer Kanüle aus dem Gradienten entnommen und in ein Wassermannröhrchen überführt. Anschließend wurde bis zur vollständigen Entfernung von EtBr mit Isopropanol ausgeschüttelt, die gefällte DNS mit wenig 1x SSC-Puffer wieder gelöst und über Nacht bei 4° C gegen 11 0,1x SSC-Puffer + 0,02M EDTA dialysiert.

13. Transformation eines Tryptophan-auxotrophen E.coli-Stammes mit Cole 1-trp-Plasmid-DNS:

E.coli KS 805-Zellen wurden aus einer in ENB-Medium + 50µg Tryptophan/ml angezüchteten ÜK (vgl. 8.2.) 1:100 im gleichen Medium verdünnt und bis zur optischen Dichte 0,6 bei 590nm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen rasch abgekühlt und 15 Min. bei 2° C im SS 34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in der Hälfte des Originalvolumens mit kalter 0,01M NaCl-Lösung gewaschen und nochmals bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden dann im gleichen Volumen kalter 0,03M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 Min. bei 0° C stehen gelassen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Pellet in 1/10 des Originalvolumens kalter 0,03M CaCl₂-Lösung aufgenommen und bei 0° C aufbewahrt

(kompetente Bakterien).

In TEN-Puffer (vgl. 3.12.) bei 0° C suspendierte Proben der ColE 1-trp-Plasmid-DNS (Konz. 1,6.-2µg/ml; vgl. 11.1.) wurde kalte 0,1M CaCl₂-Lösung bis zur Endkonzentration von 0,03M CaCl₂ zugegeben.

Anschließend wurde zu je 0,2ml der kompetenten Bakterien-suspension 0,1ml der DNS-Lösung mit kalten Pipetten zugefügt und 60 Min. bei 0° C inkubiert. Nach einem Hitze-puls von 42° C für 2 Min. wurde erneut auf 0° C abgekühlt. Nach 1 Std. wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und nach Zugabe von 2,5ml 0,6%igem Wasseragar in 2 mM NaCl auf Minimalagar (vgl. 2.1.10.) plattiert.

Kontrollplattierungen mit TEN-Puffer erfolgten gemäß 9.5.2. (nach Cohen et al., 1972; verändert).

14. Nachweis des ColE 1-trp-Plasmids durch Kreuztest:

In gewissen Zeitabständen wurde der ColE 1-trp-Plasmid besitzende Bakterienstamm JMB 9 auf das Vorhandensein dieses Plasmids hin überprüft, da beobachtet werden konnte, daß dieser Stamm das Plasmid relativ leicht verliert.

Dazu wurden mit der Impföse Proben aus einer Suspension (vgl. 8.3.) des Colicin E 1 produzierenden Bakterienstammes W 3110 entnommen und in geraden Strichen auf NB-Platten (vgl. 2.12.) aufgebracht. Nach Eintrocknen der Suspension wurden um 90° versetzt Proben des Stammes JBM 9 in gleicher Weise aufgetragen. Wachstum beider Stämme an den Kreuzungspunkten wies das ColE 1-trp-Plasmid nach. Zur Kontrolle wurde zusätzlich E.coli

C 600 kreuzgestrichen. Hemmung dieses Bakterienstammes an den Kreuzungsstellen war Nachweis für die Bildung von Colicin E 1.

15. Mikroinjektion

15.1. Geräte:

Mikroskop Laborlux II; Okulare 10 x;

Objektive: Phaco 1, L 20/0.32;

Phaco 1, L 32/0.40

Mikromanipulator, Stereolupe und Instrumentenhalter:

Fa. Leitz, Wetzlar.

Glenco Hochdruckspritze (5ml) mit Schnellkupplung und Verbindungsmuffe,

Glenco-Duplex-Mikrospritze (10ul) mit Adapter für reproduzierbare Probenabgabe und Polyäthylenschlauch:

Fa. Serva, Heidelberg.

Halterung mit Rändelschrauben-Vortrieb für Hochdruckspritze: Eigenbau der Werkstatt des Genetischen Instituts, Universität München.

15.2. Injektionskanülen:

Die Injektionskanülen wurden an einer Mikroschmiede (Eigenbau der Werkstatt des Zoologischen Instituts, Universität München) aus Glaskapillaren (Corning glass LTD.) mit ca. 1,6mm Außendurchmesser gezogen.

15.3. Siliconisierung der Injektionskanülen

Zur Siliconisierung wurden die Mikroinjektionskanülen in einen Aluminiumständer (vgl. C.1.1., Abb.2) eingesetzt und 30 Min. bei 50 Ws in einer 1,5%igen Lösung von Siliconöl AK 350 in Diäthyläther mit Ultraschall (Branson Sonifier S 125) behandelt. Anschließend wurde der Siliconölfilm 4 Std. bei 240° C im Brutschrank eingebrannt.

15.4. Injektionslösungen:

15.4.1. Phagenlysate:

Zu Rohlysaten (vgl. 9.2.2.1.) oder CsCl-gereinigten Phagenlysaten (vgl. 9.3.) in Nethelerbechern wurde Tween 40 oder Tween 80 (Endkonz. 2%) zugegeben und kräftig durchgemischt. Anschließend wurde in einer Eppendorf Zentrifuge 3200 bei maximaler Umdrehungszahl 4 Min. zentrifugiert. Der Überstand (Injektionslysate) wurde mit einer sterilen Einmalspritze aufgesaugt.

15.4.2. DNS-Lösungen:

ColE 1-Plasmid-DNS (vgl. 11.1.), λ dv-DNS und λ p_{trp}-DNS (vgl. 11.3.) wurden gemäß 15.4.1. behandelt.

15.5. Füllung der Injektionskanülen

Die gemäß 15.4.1. in eine Einmalspritze aufgesaugte Injektionslösung wurde von hinten mit einer Metallkanüle ca. 1cm hoch in die Mikroinjektionskanüle eingespritzt. Das Restvolumen wurde auf gleiche Weise mit Silikonöl AK 100 gefüllt.

15.6. Mikroinjektionsapparatur

Die mit der jeweiligen Injektionslösung gefüllte Mikrokanüle wurde in einen Instrumentenhalter eingeschraubt, der auf dem Arm des Mikromanipulators befestigt war.

Der Instrumentenhalter war über einen Polyäthylenschlauch ($\varnothing$ 3mm) mit der Glenco-Hochdruckspritze verbunden (Geräte vgl. 15.1.). Diese war in eine Halterung eingeschraubt und fest mit der Grundplatte des Mikromanipulators verbunden. Die Halterung hatte einen Rändelschrauben-Vortrieb, der mit dem Kolben der Hochdruckspritze verbunden war. Dadurch konnte der zur Injektion erforderliche Druck sehr genau reguliert werden.

Zur Übertragung des Drucks auf die Injektionsflüssigkeit war die gesamte Apparatur luftfrei mit Siliconöl AK 100 gefüllt. Vor jeder Füllung der Apparatur wurde das Siliconöl 12 Std. auf einem Magnetrührer mit angeschlossener Wasserstrahlpumpe entgast.

15.7. Aufziehen von Proben bestimmten Volumens in die Mikroinjektionskanüle:

Eine mit Injektionslysat gefüllte Mikrospritze mit angeschraubter Nadel (Spitze 12° angeschrägt, vgl. 15.1.) wurde mit einem Adapter für reproduzierbare Probenabgabe versehen und auf einem Stativ montiert, das in die Grundplatte des Mikromanipulators eingeschraubt war. Aus der Spritze wurden Proben von 1μ l so abgegeben, daß sie als Tropfen an der Nadelspitze hängen blieben. Die Proben wurden dann unter Beobachtung durch die Stereolupe

(vgl. 15.1.) in jeweils frische Mikroinjektionskanülen mit Hilfe der in 15.6. beschriebenen Apparatur aufgesaugt.

15.8. Anzucht von *Neurospora crassa*-Mikrokulturen zur Injektion:

Zur Mikroinjektion von Phagen- bzw. Plasmid-DNS-Suspensionen wurden in Petrischalen gezogene Mikrokulturen verwendet. Konidien der jeweils verwendeten Stammkulturen (vgl. 1.4.) wurden zunächst auf entsprechend supplementiertem GFS Minimalmedium (vgl. 2.2.6.) als Einzelkolonien plattiert (vgl. 10.3.). Mit einer sterilen Lanzettnadel wurden aus einer einzigen Einzelkolonie rechteckige Agarstücke mit einer Kantenlänge von ca. 3x4mm ausgestochen. Parallel wurden ebenso aus derselben Kolonie Kontrollproben zum Auxotrophietest (vgl. 10.4.) entnommen. Die ausgeschnittenen Agarstückchen wurden mit der Oberseite nach unten in die Mitte frischer Petrischalen mit Glycerol Complete Medium (vgl. 2.2.4.) übertragen. Die so inokulierten Petrischalen wurden 24-30 Std. im Kühlschrank bei ca. 7° C gehalten. Die radiär vom Inokulationsort aus wachsende Mikrokultur hatte dann einen Durchmesser von ca. 2cm erreicht. Anschließend wurde das Agarstückchen wieder entfernt. So angezogene Mikrokulturen wurden als Mutterplatten für Inokulationen zum Zweck der Mikroinjektion verwendet. Sie konnten bei Aufbewahrung im Kühlschrank etwa 5 Tage dafür verwendet werden.

Jeder Injektionsversuch einschließlich der durchgeführten Kontrollen wurde nur mit identischem Material aus ein und

derselben Mutterplatte durchgeführt. Mikroinjektionskulturen wurden unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben inokuliert. Dabei wurden jedoch nur Petrischalen mit mindestens 3 Tage altem Agarmedium verwendet. Je nach Versuchsziel wurden verschiedene Nährmedien inokuliert (vgl. 2.1.4.; 2.2.4.; 2.2.7.). Jedem Medium war Difco-Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2% zugesetzt. 2-3 Std. vor der Injektion wurden die Agarstückchen entfernt und die Mikrokulturen bei Raumtemperatur gehalten.

16. Auftrennung von Neurosporamyzel in subzelluläre Fraktionen nach Mikroinjektion:

Auf Cellophanfolie (vgl. 7.; C.1.6.) gezogene, mit λ ptrp-Phagen injizierte Neurosporamyzelien wurden 6 Tage nach Injektion abgenommen, mit flüssigem Stickstoff übergossen und in der Reibschale zu Puder zerrieben. Anschließend wurde durch differentielle Zentrifugation in subzelluläre Fraktionen aufgetrennt (nach Munkres et al., 1966).

17. Versuche zur Ausprägung prokaryotischen Erbmaterials in Neurosporazellen:

17.1. Bestimmung der Reversionsrate:

Die Reversionsrate des tryp-Markers der Stämme tryp-1a; tryp-1, his-1A bzw. ed^R -29 A wurde ermittelt, indem Konidien 7 Tage alter Standardkulturen dieser Stämme geerntet, suspendiert und gezählt wurden (vgl. 10.1., 2.) Anschließend wurden jeweils 5×10^8 Konidien, verteilt auf 10 GFS Kolben, plattiert (vgl. 10.3.). Das GFS Minimal-

medium war im Bedarfsfall mit 100µg Histidin bzw. Panthotensäure/ml supplementiert, enthielt aber kein Tryptophan. Die Bestimmung der Reversionsrate bezüglich des his-1 und pan-2 Markers erfolgte in entsprechender Weise durch Plattieren auf GFS-Minimalmedium + 50µg Tryptophan/ml.

17.2. Weiterzucht von Neurospora-Hyphenzellen nach Mikroinjektion:

Hyphenzellen, die mit λ ptrp-Phagen bzw. ColE 1-trp-Plasmid-DNS und zur Kontrolle mit λ plac, λ WT und TMG-Puffer bzw. ColE 1-Plasmid-DNS injiziert waren, wurden mit einer sterilen Lanzettadel als kleine Agarblöckchen (ca. 3x4mm Kantenlänge) aus den Mikrokulturen ausgeschnitten, auf festes Sucrose Minimalmedium (im Bedarfsfall + 100µg Histidin bzw. Panthotensäure/ml und 200µg Edein/ml) überführt und 1-10 Wochen bei 25° C weitergezüchtet.

17.3. Gewinnung tryp-prototropher Einzelkolonien (tryp⁺-Isolate):

Die Konidien wurden geerntet (vgl. 10.1.,2.), auf GFS Kolben ohne Tryptophan verteilt (1-2x10⁷ Konidien/100ml) und plattiert (vgl. 10.3.). Nach dreitägiger Bebrütung bei 25° C wurden die Platten auf makroskopisch sichtbare tryp-prototrophe Kolonien untersucht und diese auf Neurospora-culture-Röhrchen abisoliert.

17.4. Züchten von Subkulturen:

Konidienstaub, der nach 17.3. erhaltenen tryp⁺-Isolate wurde im Abstand von jeweils 7 Tagen auf festes Sucrose

Minimalmedium (vgl. 2.2.7.) überimpft.

17.5. Heterokaryontest:

Die nach 17.3. isolierten Kolonien bzw. Subkulturen davon (vgl. 17.4.) wurden auf Glycerol Complete Medium angezüchtet und geerntet (vgl. 10.1., 2.). Jeweils 300-500 Konidien wurden auf GFS Minimalmedium +/-Tryptophan plattiert und 3 Tage bei 25° C bebrütet (vgl. 10.3.). Doppelmutanten wurden jeweils mit 100µg Histidin bzw. Panthotensäure/ml supplementiert.

18. Genetische Analyse von tryp⁺-Isolaten:

18.1. Kreuzungen:

Die Kreuzungen der gemäß 17.3. erhaltenen Kolonien mit den Tryptophan-auxotrophen Stämmen tryp-1a bzw. tryp-1, his-1 A wurden in Petrischalen oder in Röhrchen mit Westergaard Medium, welches im Bedarfsfall supplementiert war, durchgeführt. Drei Tage nach Beimpfen mit dem ersten Kreuzungspartner wurde der zweite Kreuzungspartner nachgeimpft und anschließend bei 25° C bis zur Perithezienreife im Dunkeln bebrütet.

18.2. Plattierung der Ascosporen:

Aus den Kreuzungen (vgl. 18.1.) wurden reife Perithezien entnommen, in H₂O suspendiert und mit einem Glasstab aufgequetscht. Der Überstand der Ascosporensuspension wurde dekantiert, 0,1ml davon in kleinen Tropfen auf den Objektträger pipettiert und die Anzahl der Ascosporen mikroskopisch bestimmt (Schätzwert). Zur Anregung der Ascosporenkeimung und zur Abtötung von Konidien wurde die Sporensuspension anschließend 90 Min. bei 60° C im Wasserbad geschockt. Geeignete gleiche Mengen von Ascosporen wurden

in Kolben mit 100ml GFS Minimalmedium +/-Tryptophan pipettiert und plattiert ("random spore analysis").

18.3. Erstellung reiner trypt⁺-Linien:

Isolate, die nach 17.5. als heterokaryotisch bezüglich des trypt-Markers identifiziert worden waren, wurden mit einem trypt-1 Stamm gekreuzt (vgl. 18.1.). Dabei wurde das heterokaryotische Isolat vorgeimpft. Die Plattierung der Sporen erfolgte nach 18.2. auf GFS Minimalmedium ohne Tryptophan. Von den Platten wurden nach 3-tägiger Bebrütung einige trypt⁺-Kolonien (reine Linien) auf Neurospora-Culture-Röhrchen abisoliert und weitergezüchtet (trypt⁺-F₁-Isolate).

18.4. Bestimmung des Paarungstyps:

Sie erfolgte durch Kreuzung (vgl. 18.1.) der gemäß 18.3. erhaltenen trypt⁺-F₁-Isolate mit Wildtyp A und a.

18.5. Kreuzung der trypt⁺-F₁-Isolate:

Die nach 18.3. erstellten trypt⁺-F₁-Isolate wurden gemäß 18.1. mit einem trypt-1 Stamm gekreuzt. Entweder wurden die F₁-Isolate vorgeimpft oder der entsprechende trypt-1 Stamm (reziproke Kreuzung). Die Ascosporen wurden nach 18.2. auf GFS Minimalmedium +/- Tryptophan plattiert.

19. Statistische Sicherung:

Die Standardabweichung des Mittelwertes wurde nach folgender Formel aus der Quadratwurzel der Varianz berechnet:

$$G = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \cdot \sum x}{n - 1}}$$

(n = Stichprobenumfang; x = Einzelwert;
 $\bar{x}$ = Mittelwert aus den Einzelwerten).

C. ERGEBNISSE

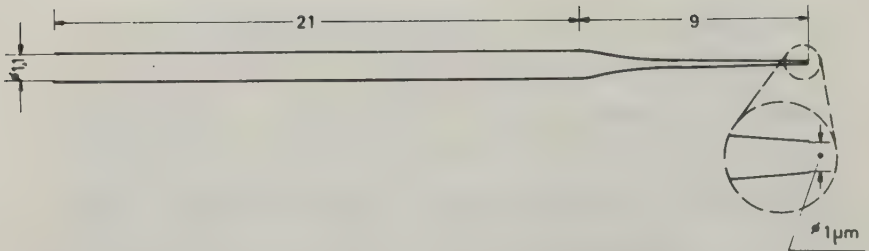
1. Mikroinjektion:

Zur gezielten Übertragung prokaryotischen Genmaterials auf die Hyphenzellen des Schimmelpilzes *Neurospora crassa* wurde - wie bereits einleitend dargelegt - die Technik der Mikroinjektion für besonders geeignet erachtet. Die Anwendung dieser Technik ist bereits von verschiedenen Autoren (Wilson, 1961; Diacumakos, 1965) für *Neurospora crassa* beschrieben, doch im Zusammenhang mit völlig anderen Fragestellungen. So konnten auch die dort erarbeiteten technischen Details für die Untersuchung der hier anstehenden Probleme nur mit weitgehenden Änderungen übernommen werden.

Im ersten Teil der Ergebnisse nimmt deshalb die Klärung methodischer Probleme bei der Mikroinjektion breiteren Raum ein. Um die Verletzung der Pilzhypen und das damit verbundene Auslaufen des Zellinhalts nach Injektion möglichst zu reduzieren, schien es wünschenswert, Mikrokanülen mit einem maximalen Spitzendurchmesser von 1 μm zu verwenden. Die oben erwähnten Autoren verwendeten bei ihren Experimenten Kanülen, deren Spitzendurchmesser im Bereich zwischen 3 und 5 μm lag.

Mikrokanülen, die der oben erhobenen Forderung entsprachen, wurden freundlicherweise vom Zoologischen Institut der Universität München zur Verfügung gestellt (vgl. B.15.2.). Für sämtliche Versuche wurden Injektionskanülen der in Abb. 1 angegebenen Maße speziell hergestellt und verwendet.

Abb. 1:



Mikroinjektionskanüle (Maße in mm)

1.1. Vorbehandlung der Mikroinjektionskanülen:

Kopac (1955) beschreibt bereits die Notwendigkeit, Mikroinjektionskanülen zur Injektion von *Neurospora crassa* beidseitig mit einem Siliconölfilm zu überziehen, um eine Koagulation des Protoplasmas und dadurch ein Verkleben der Glaskanüle zu verhindern. Die in der oben genannten Arbeit erwähnte Methode, die Kanülen mit Hilfe einer Injektionspritze mit Siliconöl zu füllen, erwies sich im vorliegenden Fall wegen des wesentlich geringeren Spitzendurchmessers als nicht durchführbar. Eine vollständige Füllung der Kanülenspitze war auch durch Anwendung hohen Drucks nicht zu erreichen. Ebenfalls negativ verliefen Versuche, mit Hilfe von Unterdruck über eine an den Instrumentenhalter angeschlossene Wasserstrahlpumpe die Innenwandung der Kanülen vollständig mit Siliconöl zu benetzen. Nach 24 Stunden war das Siliconöl nur ca. 1mm in die Kanülenspitze hochgesaugt. Wegen des enormen Zeitaufwandes und da

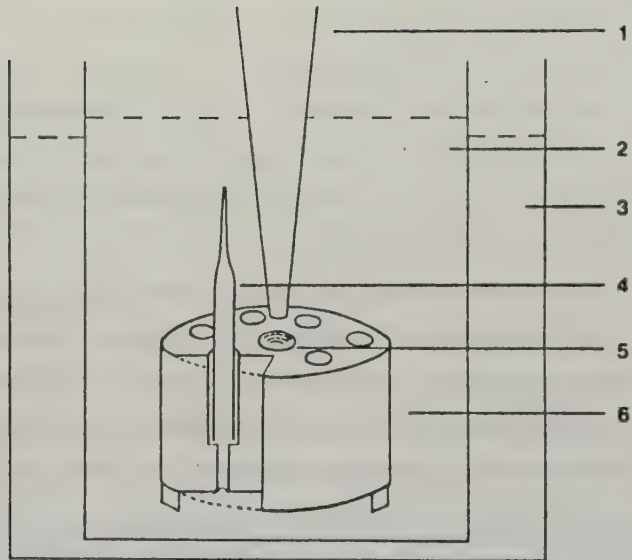
jeweils nur eine Kanüle gefüllt werden konnte, war dieses Ergebnis unbefriedigend.

Es mußte also eine neue Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe in relativ kurzer Zeit eine beliebige Anzahl von Kanülen beidseitig mit einem Siliconölfilm überzogen werden kann. Dazu wurden die Kanülen mit der Spitze nach oben in einen Aluminiumständer eingesetzt (Abb. 2).

Die Bohrung des Ständers, in den die Kanülen eingesetzt wurden, sind durch eine zweite Bohrung geringeren Querschnitts nach unten offen. Der Ständer selbst ist auf drei Schraubenfüße gesetzt. Er besitzt zentral eine durchgehende 4mm Gewindebohrung, in die zu Transportzwecken ein Gewindestab eingeschraubt werden kann. Der mit Mikroinjektionskanülen bestückte Ständer wurde dann in ein Becherglas mit Siliconisierungslösung (vgl. B.15.3.) eingetaucht, so daß der Flüssigkeitsspiegel ca. 2cm über den Spitzen lag.

Die Mikrospitze des Ultraschallgerätes (vgl. B.15.3.) wurde dann genau über der zentralen Gewindebohrung in die Lösung bis auf 0,5cm Abstand von der Oberfläche des Ständers eingetaucht. Durch eine anschließende 30-minütige Ultraschallbehandlung, deren Intensität so gewählt war, daß die empfindlichen Kanülenspitzen nicht beschädigt werden konnten (vgl. B.15.3.), wurde dann die gesamte Kanülenoberfläche einschließlich der fein ausgezogenen Spitzen beidseitig mit einem Siliconölfilm benetzt. Zum Einbrennen des Siliconölfilmes wurde der Ständer mit den Kanülen dann in einen Trockensterilisationsschrank

Abb. 2:



Siliconisierung der Mikroinjektionskanülen in einem
Kanülenständer mit Hilfe von Ultraschall.

Zeichenerklärung: 1 = Mikrospitze des Ultraschallgerätes
2 = Siliconisierungslösung
3 = Eiswasser
4 = Mikroinjektionskanüle
5 = Gewinde
6 = Kanülenständer

überführt (vgl. B.15.3.). Eingebrennte Injektionskanülen wurden bis zur Verwendung in einem steril verschlossenen Ständer aufbewahrt (Zettler, 1970).

1.2. Gewinnung eines zur Mikroinjektion geeigneten Phagen-
lysats:

Durch die geringe Spitzenöffnung der Injektionskanülen von maximal $1\mu\text{m}$ gelang es zunächst nicht, Phagenlysate zu ejizieren, obwohl mit Hilfe der verwendeten Apparatur (vgl. B.15.6.) hoher Druck auf die Injektionsflüssigkeit ausgeübt werden konnte. Trotz des eingebrennten Siliconüberzugs der Glaskanüle war die Oberflächenspannung der wässrigen Injektionslösung in der feinen Spitzenöffnung nicht zu überwinden.

In Parallelversuchen mit Kanülen eines Spitzendurchmessers zwischen 3 und $5\mu\text{m}$ genügte der im hier verwendeten System erzeugbare Druck zur Ejektion. Es wurden deshalb Versuche unternommen, die Oberflächenspannung der zu injizierenden Flüssigkeit mit geeigneten Mitteln zu senken. Detergenszusatz erschien geeignet, jedoch mit der Einschränkung, daß eine biologische Beeinträchtigung der zu injizierenden Bakteriophagen wie der injizierten Pilzhyphe geschlossen werden mußte. Die neutralen Detergentien Tween 40 und Tween 80 wurden deshalb in verschiedenen Konzentrationen den zu injizierenden Phagenlysaten (Injektionslysate) zugesetzt (vgl. B.15.4.1.). Bei einem Gehalt von 2% Tween 40 bzw. Tween 80 konnte das Injektionslysate bereits ejiziert werden. Es war nun zu prüfen, ob der Detergenszusatz Einfluß auf die Plaquebildungsfähigkeit

Tabelle 1:

Bestimmung des Phagentiters in Form von "plaque forming units" (p.f.u.) nach Detergensenzusatz im Rohlysat von λ ptrp-Phagen während unterschiedlicher Inkubationsdauer bei 25° C. In der Kontrolle wurde anstelle des Detergens jeweils die gleiche Menge Puffer (vgl. B.3.3.) zugesetzt.

Detergens	Detergens- Konz.in %	Inkubations- zeit in Std.	p.f.u.nach Detergens- zusatz(x10 ⁷)	p.f.u.nach Pufferzusatz (x10 ⁷)
Tween 40	2	2	130	135
	2	48	132	125
	5	2	128	122
	5	48	120	133
	10	2	132	126
Tween 80	2	2	135	140
	2	48	120	131
	5	2	124	133
	5	48	120	119
	10	2	112	120

der Bakteriophagen hat. Dazu wurden nach verschiedenen Zeiten bei 25° C Proben aus den Injektionslysaten entnommen und durch Titration (vgl. B.9.4.) auf entsprechenden Indikatorbakterien geprüft. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse derartiger Versuche dargestellt.

Sowohl bei Zusatz von Tween 40 wie Tween 80 konnte bei einer Konzentration bis zu 10% im untersuchten Zeitraum kein schädigender Effekt festgestellt werden. Ebenso war am Hyphenwachstum des Pilzmyzels nach Kontrollinjektionen Tween-haltiger Pufferlösungen in den entsprechenden Konzentrationen keine Hemmung oder sonstige makroskopisch

erkennbare morphologische Veränderung zu bemerken. Mit Tween-haltiger Lösung injizierte Kulturen wiesen nach 2-tägiger Bebrütung bei 25° C dieselbe Wachstumsrate auf wie nicht injizierte Kontrollen.

1.3. Nachweis der Infektiosität von λ -Phagen in Form von "plaque forming units" nach Ejektion aus der Mikrokanüle:

Die Infektionsfähigkeit eines Bakteriophagen ist u. a. abhängig von der äußeren Intaktheit des Phagenpartikels. Im Falle der hier verwendeten λ -Phagen insbesondere von der Intaktheit des fragilen Phagenschwanzes. Auftretende Scherkräfte und mechanische Beanspruchung führen sehr leicht zu seinem Verlust und damit auch zum Verlust der Infektiosität des gesamten Partikels.

Bei Ejektion von Bakteriophagen durch eine Kanülenöffnung so geringen Querschnitts wie sie hier verwendet wurde, treten vor allem durch den erforderlichen hohen Druck starke Scherkräfte auf. Es war deshalb zu prüfen, ob in ejiziertem Phagenlysat Bakteriophagen noch als "plaque forming units" (p.f.u.) nachzuweisen sind.

Dies wurde auf zweifache Weise untersucht:

- a) Auf einer TB-Platte (vgl. B.2.1.2.) wurden E.coli C 600 Bakterien frisch ausplattiert. Nach Eintrocknen der Bakteriensuspension wurde λ ptrp-Lysat gemäß B.15.6. durch die Injektionskanüle ejiziert und an bestimmten, vorher markierten Stellen direkt auf den Bakterienrasen aufgetropft. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 41° C bebrütet.

b) Anstelle der in a) verwendeten TB-Platten wurde Phagen-
lysat direkt in Petrischalen mit 5ml TMG-Puffer
(vgl. B.3.3.) injiziert. Der Puffer wurde dann gemäß
B.9.4. titriert.

In beiden Versuchsansätzen konnten λ -Phagen als p.f.u.
nachgewiesen werden.

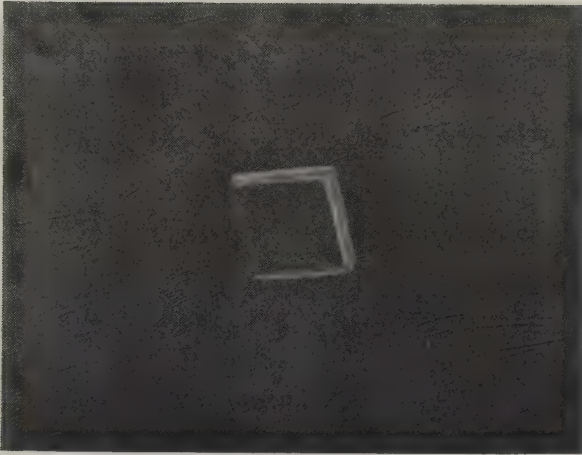
Um die Anzahl der p.f.u. nach Ejektion aus der Mikrokanüle
quantitativ zu bestimmen, wurde Versuchsansatz b) folgender-
maßen verändert: Der Titer des λ ptrp-Phageninjektionslysats
wurde gemäß B.9.4. bestimmt. Dann wurde 1 μ l dieses Lysats
entsprechend B.15.7. in die Mikroinjektionskanüle aufge-
sogen, anschließend wieder in 5ml TMG-Puffer ejiziert und
der Phagentiter erneut durch Titration bestimmt. In drei
unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten konnte
kein Unterschied im Phagentiter vor bzw. nach Ejektion
durch die Mikrokanüle festgestellt werden.

Damit war gezeigt, daß die λ -Phagen trotz mechanischer
Beanspruchung bei der Ejektion durch die Mikrokanüle ihre
Infektiosität nicht verloren; eine wichtige Voraussetzung
für die weiteren Experimente.

1.4. Mikrokulturen von Neurospora crassa und Mikroinjektions- technik:

Das für Mikroinjektionszwecke erarbeitete Anzuchtverfahren
für Mikrokulturen (vgl. B.15.8.) des Schimmelpilzes *N.crassa*
brachte gegenüber der von Wilson (1961) beschriebenen
Methode eine Reihe wesentlicher Vorteile.

Abb. 3:



Gemäß B.15.8. angezogene Mikrokultur des *N. crassa*-Stammes try-1, a, etwa 30 Std. nach Inokulation bei ca. 7° C. Zentral ist das zur Inokulation dienende Agarblöckchen zu sehen. Der kreisförmige Rand rührt von der auf die Agaroberfläche aufgelegten Cellophanfolie (vgl. C.1.6.) her.

Die nach Inokulation der Mikrokultur ungünstigen Wachstumsbedingungen in der Kälte (vgl. B.15.8.) hatten zur Folge, daß die "baumartige" Verzweigungstendenz der Pilzhypphen (s. Abb. 3) gegenüber einer Anzucht bei 25° C stark eingeschränkt war. Die Folge war eine für Mikroinjektionszwecke wichtige Entflechtung der Hyphenzellen sowie die Tatsache, daß unter diesen Bedingungen sich das Myzel fast ausschließlich auf der Oberfläche des Agarmediums ausbreitete. Nur in sehr geringem Maß wuchsen Hyphen-Zellen in das Agarmedium ein, bzw. verzweigten sich

in den Luftraum über der Agar-Oberfläche. Weiterhin war unter diesen Bedingungen eine Zunahme des Hyphendurchmessers zu beobachten. Durchschnittlich erreichte dieser 20-25 μ m, gegenüber 10-15 μ m bei Wilson. Die Länge der Hyphenzellen betrug in Übereinstimmung mit Wilson's Werten 100-200 μ m.

Diese "entflochtene" Anzucht der Myzelkulturen machte es ferner möglich, geeignete Injektionsbereiche im Myzel bereits makroskopisch auf der Platte zu erkennen und vor Injektion vom Boden der Petrischale her farbig zu markieren.

Abb. 4:



Mikroinjektion von Hyphenzellen des *N. crassa*-Stammes tryp-1, a. Zur optischen Verdeutlichung des Injektionsvorganges wurde Siliconöl als Injektionsflüssigkeit benutzt, da es sich nicht mit dem Zellplasma vermischt. Es ist deutlich als hell durchscheinender Zellinhalt in Gegensatz zum granulären Zellplasma zu erkennen.

Pfeil 1: Einstichort der Mikroinjektionskanüle
Pfeil 2: Meniskus des injizierten Siliconöls

Entsprechend den detaillierten Angaben bei Wilson haben sich die Verzweigungspunkte von Hyphen (Abb. 4) als günstige Einstichorte für die Mikrokanüle erwiesen. Der Einstich der Nadel erfolgte dabei immer in Richtung auf die Hyphenspitze. Durch den geringen Spitzendurchmesser der Mikrokanülen von $1\mu\text{m}$ brachte das Durchdringen der rigiden Zellwand keine Probleme. Ein Schleifen der Mikrospitzen - wie es Wilson beschreibt - war daher nicht notwendig, ebenso wenig eine Herabsetzung der Zellturgescenz.

Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Mikroinjektion war jedoch ein kontinuierlicher Strom des Zellplasmas durch die durch Poren offen miteinander in Verbindung stehenden, schlauchförmigen Hyphenzellen des Pilzmyzels. War dieser Plasmastrom einmal zum Erliegen gekommen, war eine erfolgreiche Injektion nicht mehr möglich. Die angestochene sowie in den meisten Fällen die beiden benachbarten Zellen liefen dann kurze Zeit nach Injektion aus. Durch Überführung der zu injizierenden Mikrokulturen in Raumtemperatur einige Stunden vor Mikroinjektion konnte nun erreicht werden, daß in 80% der Fälle ein rasch fließender, kontinuierlicher Plasmastrom induziert wurde, der während und nach Injektion weiterhin bestand.

Durch Injektion kleiner Tröpfchen von Siliconöl (AK 100), die mit dem in Richtung Hyphenspitze fließenden Zellplasma als diskret beobachtbare Bestandteile mittransportiert werden, wurde in einigen Fällen die Geschwindigkeit

des Plasmastroms ermittelt. Dabei wurde jeweils die Durchgangszeit der Öltröpfchen auf einer Strecke von $100\mu\text{m}$ bestimmt. Bei insgesamt 5 voneinander unabhängigen Messungen in verschiedenen Mikrokulturen konnte dabei unter den gewählten Bedingungen eine Minimalgeschwindigkeit von $4,5\text{cm/Std.}$ und eine Maximalgeschwindigkeit von 18cm/Std. ermittelt werden.

Bei diesen relativ raschen Plasmaströmungen konnte die Injektionskanüle bis zu 10 Min. in der angestochenen Hyphenzelle ohne beobachtbare schädigende Wirkung verbleiben. Ebenso war es möglich, über einen solchen Zeitraum hinweg die entsprechenden Injektionslysate unter vorsichtigem Druck dem Zellplasma zuzuführen, wodurch das injizierte Material in Richtung zu den Hyphenspitzen mittransportiert wurde. Meist wurden die Injektionen jedoch nach 1-2 Min. durch vorsichtiges Zurückziehen der Mikrokanüle beendet. In etwa 50% der Fälle war dies ohne Unterbrechung des Plasmaflusses möglich.

Sämtliche Mikroinjektionsexperimente wurden unter mikroskopischer Beobachtung bei 200- bzw. 320-facher Vergrößerung (vgl. B.15.1.) in einem ständig keimfrei gehaltenen, eigenen Raum durchgeführt. Zur Fixierung der Petrischalen mit den zu injizierenden Mikrokulturen war auf den Kreutztisch des Mikroskops eine spezielle Halterung aufgeschraubt.

1.5. Nachweis von Bakteriophagen im Pilzmyzel nach

Mikroinjektion:

Nachdem die Technik der Mikroinjektion, die dafür geeignete Zusammensetzung des Phagenlysats und die erforderlichen Mikrokulturbedingungen für den Schimmelpilz *Neurospora crassa* entwickelt waren, galt es als nächstes Ziel, die ins Pilzmyzel injizierten Bakteriophagen experimentell nachzuweisen. Es mußte also eine Methode zur Reisolierung injizierter λ -Phagen aus den Hyphenzellen von *N. crassa* erarbeitet werden. Dadurch sollte Aufschluß über das Schicksal der Phagen in den Eukaryotenzellen gewonnen werden, d.h. über die Verteilung der Phagen in den durch Poren offen miteinander verbundenen Hyphenzellen sowie über den Zeitpunkt der Degradation ihrer Proteinhülle. Ein nachweisbarer Verlust der Infektiosität injizierter Phagenpartikel könnte als Indiz dafür angesehen werden. Mit diesem vorgezeichneten Ziel wurden deshalb eine Reihe von Experimenten unternommen. Die Mehrzahl davon wurden mit dem ϕ 80 - λ dhis-Phagen und der tryp-1, his-1, A Doppelmutante von *N. crassa* durchgeführt, im späteren aber desgleichen mit dem Bakteriophagen λ p_{trp} und den Tryptophan-Mangelmutanten tryp-1, a bzw. tryp-1, his-1, A.

Grundlegende Idee sämtlicher Experimente dieser Versuchsserie war es, die Hyphenzellen des wachsenden Pilzmyzels mechanisch oder osmotisch so zu öffnen, daß das Zellplasma und damit die darin befindlichen Bakteriophagen frei werden. Ihr Nachweis sollte dann durch Überschichtung des zerstörten Pilzmyzels mit Indikatorbakterien erfolgen. Durch dieses titrationsähnliche Verfahren sollten nach

Bebrütung der Mikrokulturen an den Stellen, an denen Bakteriophagen aus den Pilzzellen freigesetzt werden Lysiszonen oder einzelne Plaques auftreten. Um dem Bakterienrasen optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurden die *N.crassa*-Mikrokulturen für die hier beschriebenen Versuche auf entsprechend supplementiertem TB-Medium (vgl. B.2.1.2.) angezogen. Eine Beeinträchtigung des Myzelwachstums war dabei in keinem Fall festzustellen. Die Mikrokulturen (vgl. B.15.8.) wurden mit λ -Phagen an mehreren markierten Stellen injiziert und anschließend 20 Std. bei 25° C im Brutraum bebrütet.

1.5.1. Mechanische Myzelaußschlußverfahren

Aus 0,2mm starken und 4cm breiten V2A-Blechstreifen wurden kreisrunde Ausstechformen mit 2,5cm, 4cm und 5cm Durchmesser hergestellt. An einer Seite waren diese Blechstreifen so geschliffen, daß eine scharfe Schnittkante entstand. Diese scharfkantigen, autoklavierten Blechformen wurden dann konzentrisch von der Mitte der Petrischale aus in die oben beschriebenen Myzelkulturen leicht eingedrückt. Die an den Schnittstellen befindlichen Hyphenzellen wurden dadurch zerstört. Das Auslaufen des Zellplasmas an diesen Stellen konnte mikroskopisch beobachtet werden. Anschließend wurden die so behandelten Myzelkulturen mit *E.coli*-Indikatorbakterien überschichtet. Je 0,15ml Bakterienstamm-suspension (vgl. B.8.3.) waren dafür in 4ml 0,6%igem Wasseragar suspendiert. Über Nacht wurde dann bei 41° C bebrütet. Bei dieser Temperatur war kein weiteres Myzelwachstum mehr festzustellen, während das Wachstum der Bakterien zu einem geschlossenen Rasen führte.

Zur Kontrolle der Methode wurde parallel zu jedem Experiment die Schnittkante der zuvor in Phageninjektionslysats (vgl. B.15.4.1.) getauchten Rundbleche in Petrischalen mit und ohne Myzel eingedrückt. Diese Kontrollplatten wurden anschließend wie oben mit Bakterien überschichtet und bebrütet. Die Kontrollen sollten zeigen, ob durch diese Aufschlußmethode die Phagen nicht zu tief in den Agar gedrückt werden und deshalb eventuell mit dem Zellplasma frei werdende Phagenpartikel im Experiment nicht nachzuweisen wären. Die Kontrollergebnisse zeigten entlang den konzentrischen Schnittkanten Lysiszonen im Bakterienrasen, die jedoch sehr unterschiedlich klar und manchmal wenig eindeutig waren. Mit Pasteurpipetten daraus entnommene und mit Indikatorbakterien gemäß B.9.6. plattierte Proben erbrachten aber klare Plaques. Ein ebenso positives Ergebnis konnte aber in keinem der 10 durchgeführten Experimente erzielt werden. In den Fällen, in denen scheinbar Lysiszonen entlang den Schnittkanten im Bakterienrasen zu beobachten waren, brachten Probeentnahmen und anschließende Plattierung keinen positiven Phagennachweis.

Da die Schnittkanten der beschriebenen Rundbleche eventuell zu stumpf gewesen sein könnten, wurden in den anschließenden Experimenten die Zellen der injizierten Myzelkulturen mit Rasierklingen angeschnitten. So war es auch möglich, die Schnitte zahlreicher und dichter aneinander zu setzen. Dennoch konnte auch mit dieser Methode kein positiver Nachweis der injizierten Bakteriophagen geführt werden.

1.5.2. Chemische bzw. osmotische Myzelaufschlußverfahren:

1.5.2.1. Behandlung der injizierten Myzelkulturen mit Pimaricin:

Unter der Annahme, daß das im Pilzmyzel zu den Hyphenspitzen strömende Zellplasma die injizierten λ -Phagen mittransportiert, durfte man erwarten, daß nach einiger Zeit in diesem Bereich Bakteriophagen nachweisbar sein sollten. Da die Hyphenspitzen noch keine rigide Zellwand besitzen, ist in diesem Bereich die Anwendung chemischer Agentien, welche die Zellmembran angreifen und zerstören, besonders geeignet. Eine derartige Wirkung auf die Zellmembran von Pilzen (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., u.a.) ist für das auch humanmedizinisch angewandte Antimykotikum Pimaricin beschrieben (Raab, 1972). Vorversuche an Mikrokulturen von *N.crassa* ergaben, daß nach kreisförmigem Auftropfen von 0,4ml 1%iger Pimaricinlösung auf die Hyphenspitzen etwa 80% der Zellen zerstört waren (Inkubationsdauer 12 Std.; 34° C) und das Zellplasma ausgelaufen war.

Es wurde deshalb versucht, diese Wirkungsweise des Antimykotikums für den Nachweis injizierter Bakteriophagen im ausgelaufenen Zellplasma zu verwenden. Auf dem Boden der Petrischalen mit den injizierten Myzelkulturen wurde der Radius der Hyphenspitzen zum Zeitpunkt der Injektion farbig markiert (ca. 2cm). Die Kulturen wurden dann 4-6 Std. bei 25° C bebrütet. In dieser Zeit vergrößerte sich der Radius der Hyphenspitzen um ca. 1cm. Der nun erreichte Wachstumsradius wurde wie oben markiert.

Auf die kreisförmige Fläche zwischen den beiden Radien wurde dann 0,2ml Primaricinlösung aufgebracht. Kontrollversuche hatten gezeigt, daß diese Konzentration nach Überschichtung mit Indikatorbakterien gerade nach die Bildung eines geschlossenen E.coli-Rasens ermöglichte. Wie die mikroskopische Betrachtung der Hyphenspitzen ergab, wurden durch diese notwendige Konzentrationserniedrigung nur noch ca. 50% der Zellen zerstört.

Insgesamt wurden 12 Experimente durchgeführt. Um weiteres Myzelwachstum vom Zentrum der Platte her während der 14-stündigen Einwirkungsdauer des Antimykotikums möglichst einzuschränken, wurde eine Hälfte der Kulturen bei ca. 7° C im Kühlschrank inkubiert, die andere Hälfte bei 41° C im Brutschrank. Durch anschließende Überschichtung mit Indikatorbakterien wurde - wie in C.1.5.1. beschrieben - versucht, die injizierten λ -Phagen nachzuweisen. Sämtliche Ergebnisse waren jedoch negativ.

1.5.2.2. Protoplastierung des injizierten Pilzmyzels:

Die Tatsache, daß nur ca. 50% der Hyphenspitzenzellen ihr Plasma nach Pimaricinbehandlung verloren hatten sowie die nur selektiv auf die Hyphenspitzen mögliche Anwendung dieses Antibiotikums erschien unbefriedigend. Es galt deshalb weitere methodische Möglichkeiten zur Klärung der anstehenden Frage zu untersuchen.

Geeignet erschien hierzu die Protoplastierung der gesamten injizierten Myzelkultur in hyperosmolarem Medium und anschließende Überschichtung mit hypoosmolarem Medium,

d.h. mit Indikatorbakterien in 0,6%igem Wasseragar. Zur Protoplastierung, also zum Abbau der Zellwand und Freisetzen der Protoplasten, wurden zwei verschiedene Enzymlösungen verwendet:

Lösung 1: Gereinigtes Schneckenenzym (Helicase; Wittmann, 1973) in hyperosmolarer Lösung (vgl. B.3.13.); Enzymkonzentration 10mg/ml.

Lösung 2: 10%ige Lösung von Glucuronidase in Sorbitolpuffer (vgl. B.3.8.).

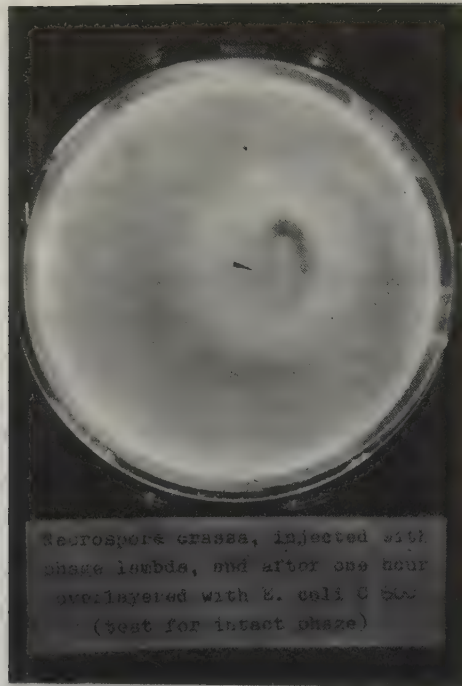
Vier bis sechs Stunden nach Injektion des Phagenlysats wurden 4ml von Lösung 1 bzw. Lösung 2 auf die Mikrokonturen aufgetropft. Bei Raumtemperatur wurde dann 2-4 Std. inkubiert, bis die Enzymlösung vollkommen in das Agarmedium eingezogen war und die Myzeloberfläche wieder trocken erschien. Kontrollexperimente mit nicht injizierten Myzelien zeigten, daß dies nach Überschichtung mit Indikatorbakterien für die Bildung eines gleichmäßigen Bakterienrasens entscheidend war. Reste der Enzymlösungen auf der Agaroberfläche führten zu keinem geschlossenen Bakterienrasen und verfälschten so die Ergebnisse. Lösung 2 zeigte bezüglich der Geschlossenheit des Bakterienrasens ebenfalls Nachteile, während die Protoplastierung mit dieser Lösung etwa doppelt so schnell erfolgte als mit Lösung 1. Weiterhin war es für das Einziehen der Lösungen wichtig, daß mindestens 3 Tage alte Nährmedienplatten zur Anzucht der Injektionskulturen verwendet wurden. Frisch gegossene Platten nahmen keinerlei zusätzliche Flüssigkeit auf. Je 5 Experimente wurden mit Lösung 1 bzw. Lösung 2 durchgeführt. Der Versuch des Phagennachweises erfolgte jeweils

wie in C.1.5.1. beschrieben.

Zur Überprüfung der Methodik wurden in Kontrollexperimenten je 200 Phagen aus der entsprechenden Verdünnung des Injektionslysats auf nichtinjizierte Mikrokulturen aufgespreitet und 4-6 Std. bei 34° C inkubiert. Wie oben beschrieben, wurde anschließend Enzymlösung 1 bzw. 2 aufgetropft und nach weiteren 2-4 Std. mit Indikatorbakterien überschichtet. In diesen Kontrollen konnten nach Bebrütung über Nacht bei ca. 41° C alle eingebrachten Phagen in Form von p.f.u. nachgewiesen werden.

Von den insgesamt durchgeführten 10 Experimenten waren 3 erfolgreich. Zwei der Experimente waren mit Enzymlösung 1, eines mit Lösung 2 durchgeführt. In allen 3 Fällen zeigte sich ca. 2cm distal vom Injektionsort genau in Wachstumsrichtung der injizierten Hyphen eine sichelförmig ausgebildete Zone konfluenter Lyse im Rasen der Indikatorbakterien (Abb. 5). Mit Pasteurpipetten daraus entnommene und gemäß B.9.6. titrierte Proben wiesen Phagen nach. Am markierten Injektionsort selbst zeigte sich nur in 2 der durchgeführten Experimente eine radiäre Lysiszone von 2-3mm Durchmesser im Bakterienrasen. In keinem Fall konnte eine in Richtung des Hyphenwachstums "verschmierte" Zone konfluenter Lyse beobachtet werden. Dies wäre zu erwarten gewesen, wenn Bakteriophagen bei unsachgemäßer Injektion an der Oberfläche des wachsenden Myzels in distaler Richtung weiterbefördert worden wären.

Abb. 5:



Nachweis von λ ptrp-Phagen nach Mikroinjektion im Myzel des *N. crassa*-Stammes tryp-1, a. Konfluente Lyse in einem Rasen von *E. coli* Indikatorbakterien, die nach Behandlung des Pilzmyzels mit gereinigtem Schneckenenzym dem Myzel überschichtet wurden.

Der Pfeil markiert den Ort der Mikroinjektion.

**1.5.3. Aufschluß des injizierten Pilzmyzels nach Anzucht der
Mikrokulturen auf Cellophanfolie:**

Die Tatsache, daß es mit Hilfe der in C.1.5.2.2. beschriebenen Methode nur möglich war, Phagen in Zonen gehäuften Auftretens nachzuweisen, nicht aber einzelne Phagen in Form diskreter Plaques, erschien noch unbefriedigend.

Der Umstand jedoch, daß die beschriebenen Zonen konfluenter Lyse jeweils distal vom Injektionsort auftraten, deutete bereits einen Transport des injizierten Phagenmaterials im Plasmastrom der Pilzhypen an. Die dadurch erfolgende Verteilung der applizierten Phagenpartikel im reich verzweigten Myzel müßte also zu einer Verdünnung der Phagen führen, so daß im Nachweisverfahren an manchen Stellen auch Einzelplaques auftreten sollten. Dies war jedoch mit der oben beschriebenen Methode nicht zu belegen. Wie sich zeigte, war einer der Hauptgründe dafür im gewählten Anzuchtverfahren zu suchen. Ein beträchtlicher Teil der Hyphenzellen des Myzels wächst dabei nach Bebrütung bei 25° C nicht an der Oberfläche des Agarmediums, sondern dringt tief in dieses ein. Diese Pilzzellen waren mit der in C.1.5.2.2. beschriebenen Methode aber nicht zu erfassen und damit waren injizierte Phagen einem eventuellen Nachweis entzogen.

Um genauere Kenntnis über die Verteilung injizierter Bakteriophagen im Pilzmyzel zu erhalten, mußten also neue Methoden in der Anzucht von Mikrokulturen und deren Aufschluß zum Phagennachweis erarbeitet werden.

1.5.3.1. Anzucht von N.crassa-Mikrokulturen auf Cellophanfolie

Zunächst mußte sichergestellt werden, daß sämtliche Hyphenzellen der Myzelkultur sich nach Phageninjektion nur auf der Oberfläche des Agarmediums ausbreiten konnten. Dafür wurde ein aus - für Wasser und Nährstoffe permeabler - Cellophanfolie (vgl. B.7.) kreisrunde Scheiben ausgeschnitten, deren Durchmesser genau der Oberfläche des

Agarmediums (vgl. B.2.2.7.) in den Petrischalen entsprach. Die Cellophanscheiben wurden in 70%igem Äthanol keimfrei gemacht und der Alkohol anschließend in sterilem Aq. dest. ausgewaschen. Dann wurden die Folien auf das Agarmedium aufgelegt. Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit zwischen Agaroberfläche und Cellophan wurden mit einem Spretter herausgedrückt. Um die Cellophanoberfläche vollkommen zu trocknen und zugleich eventuelle Kontaminationen zu erkennen, wurden die Platten dann 1 Tag bei 34° C im Brutschrank gehalten.

Entsprechend B.15.8. wurde anschließend auf der Cellophanfolie die Mikrokultur inokuliert. Das Wachstum einer derartig angezogenen Pilzkultur war nur geringfügig retardiert gegenüber der direkten Anzucht auf dem Nährmedium.

1.5.3.2. Reisolierung injizierter Bakteriophagen nach Aufschluß des Pilzmyzels durch Protoplastierung und Ultraschallbehandlung:

Der entscheidende Vorteil dieses neuen Anzuchtverfahrens bestand darin, daß nun nach Phageninjektion das gesamte Pilzmyzel zur Untersuchung verfügbar war. Von der Cellophanfolie konnte das Myzel mit Hilfe einer Lanzettnadel sehr leicht abgehoben, gesammelt und weiteruntersucht werden.

Dazu wurde folgende Methode entwickelt:

Mit einer glühenden Lanzettnadel wurde 6-8 Stunden nach Mikroinjektion der Bereich um den markierten Injektionsort circular im Durchmesser von 4mm ausgeschnitten und entfernt, um die Herkunft eventuell im übrigen Myzel

nachweisbarer Phagen klar gegenüber solchen Phagen abzugrenzen, die am Injektionsort aus der punktierten Hyphenzelle ausgelaufen sein könnten. Dann wurde das gesamte übrige Myzel mit einer sterilen Lanzettadel gesammelt und in einen sterilen Nethelerbecher überführt. Nach Zugabe von 1ml der Enzymlösung 2 (vgl. C.1.5.2.2.) wurde bei Raumtemperatur 30 Min. inkubiert.

Danach wurde das Gemisch für 30 Sek. bei 50 Ws durch die Mikrospritze des Ultraschallgerätes (vgl. B.15.3.) beschallt. Vorher erfolgte Kontrolltitrationen von λ -Phagenlysaten vor und nach dieser Ultraschallbehandlung haben gezeigt, daß dadurch keinerlei Verlust an "plaque formingunits" eintritt. Zweck dieser Ultraschallbehandlung war es einmal, die vollkommene Zerstörung der Pilzzellen sicherzustellen und zum anderen möglicherweise an Zellbestandteilen oder -organellen adsorbierte Phagenpartikel wieder freizusetzen. Das ultrabeschallte Gemisch wurde anschließend in einer Eppendorf-Zentrifuge 2 Min. bei 15000g zentrifugiert und der Überstand mit entsprechenden Indikatorbakterien titriert (vgl. B.9.4.).

In allen untersuchten Fällen konnten mit dieser Methode Phagen im Überstand der zerstörten Pilzzellen in Form von p.f.u. nachgewiesen werden. Damit war zunächst gezeigt, daß Bakteriophagen nach Mikroinjektion im wachsenden Myzel mit dem Plasmastrom in Richtung zu den Hyphenspitzen und vom Injektionsort weg transportiert werden.

1.6. Interzelluläre Verteilung von λ -Phagen im Myzel von *N.crassa* nach Mikroinjektion

Mit der Entwicklung geeigneter Verfahren zur Anzucht der Pilzkulturen und Reisolierung injizierter Bakteriophagen (vgl. C.1.5.3.) waren nun die Voraussetzungen für eine differenzierte Untersuchung der Phagenverteilung im wachsenden Pilzmyzel geschaffen.

Die Anzucht der Mikrokulturen auf Cellophanfolie (vgl. C.1.5.3.1.) wurde zur Optimierung der Mikroinjektion noch dadurch verbessert, daß in das Zentrum der Folie ein Loch ($\varnothing$ 8mm) eingestanzt wurde. In diesem zentralen Bereich erfolgte nun die Inokulation (vgl. B.15.8.) direkt auf dem Nährmedium. Dadurch konnten wieder die bereits in C.1.4. genannten, für eine erfolgreiche Injektion wichtigen Werte hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit, Plasmastrom und Hyphendurchmesser erreicht werden. Wenn die Folie fest auf dem Agarmedium aufliegt, stellt der Rand des Stanzloches nur eine geringe Barriere für die Hyphenzellen des Myzels dar, so daß der weitaus größte Teil auf der Folienoberfläche weiterwächst. (vgl. Abb. 3)

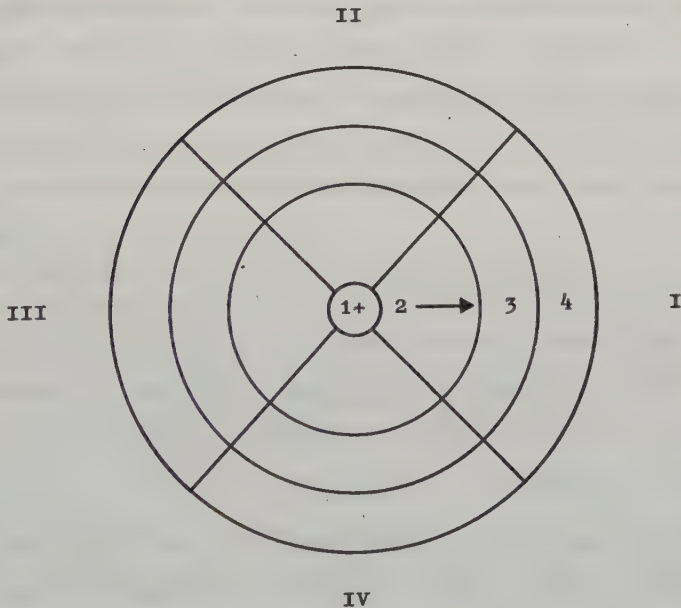
Nach Abnahme des Inokulationsblöckchens wurden zur Injektion geeignete, auf der Folienoberfläche weiterwachsende Hyphenstränge makroskopisch ausgewählt und der Injektionsbereich - innerhalb des ausgestanzten Folienkreises - sowie die Wuchsrichtung markiert (vgl. C.1.4.). Durch Mikroinjektion innerhalb der Folienöffnung konnte noch eindeutiger festgestellt werden, daß eventuell später im Pilzmyzel nachweisbare Phagenpartikel nicht auf Grund methodischer

Fehler bei der Injektion dorthin gelangt sein konnten.

Um nun genauere Daten über die Verteilung injizierter Bakteriophagen im Plasma der Hyphenzellen zu erhalten, wurde folgendermaßen verfahren:

Vor Abnahme des injizierten Pilzmyzels wurde die gesamte Petrischalenkultur durch farbige Markierung auf dem Boden der Platte in Sektoren und Segmente unterteilt (Abb. 6).

Abb. 6:



Markierung des Petrischalenbodens einer *N.crassa*-Mikro-
kultur zum Myzelaufschluß und Phagennachweis nach Mikro-
injektion. Der Pfeil gibt die markierte Wachstumsrichtung
der injizierten Pilzhyphe an, + bezeichnet den Injektions-
ort. Der Abstand der distalen Segmentgrenze vom Platten-
mittelpunkt beträgt jeweils für 1 = 0,4cm; 2 = 2,5cm;
3 = 3,5cm; 4 = 4,5cm.

Die Einteilung in 4 gleichgroße Sektoren (I-IV) wurde dabei so vorgenommen, daß die zum Zeitpunkt der Injektion markierte Wachstumsrichtung des injizierten Hyphenstranges zentral in Sektor I zu liegen kam. Durch konzentrische Markierungen wurden diese Sektoren dann noch in 4 Segmente (1-4) unterteilt. Segment 1 stellt dabei jeweils den nicht von Cellophanfolie bedeckten Inokulationsraum mit dem markierten Injektionsort dar. Dann wurde Myzel und Folie mit einer glühenden Lanzettadel entlang den Sektorengrenzen und anschließend entlang den Segmentgrenzen durchtrennt. Das Myzel jedes einzelnen Segments wurde von der Folie abgehoben und je in einen sterilen Nethelerbecher überführt. Myzel-aufschluß und Phagennachweis durch Titration erfolgten wie in C.1.5.3.2. beschrieben. Segment 1 (Inokulationsbereich) wurde als ganzes kreisförmig ausgeschnitten.

Die injizierten Kulturen wurden bei 25° C im Brutraum gehalten, 24 bzw. 48 Std. nach Mikroinjektion sektoriert und dann aufgeschlossen. Sämtliche Daten wurden durch Injektion von λ ptrp-Rohlysate (vgl. B.9.2.1.+B.9.2.2.1.) in Hyphen der Tryptophan-auxotrophen *N.crassa*-Mutante tryp 1, a erhalten.

Die experimentellen Befunde (Tabelle 2 und 3) zeigten nun übereinstimmend, daß die injizierten λ -Phagen mit dem Plasmastrom der Hyphenzellen im Pilzmyzel verteilt werden. Da bei den hier dargestellten Versuchen jeweils nur 1 Injektion pro Mikrokultur durchgeführt wurde, zeigten die Ergebnisse gleichzeitig, daß die Verteilung der Phagen hauptsächlich in dem sektoral sich verzweigenden injizierten

Hyphenstrang erfolgt. Nur wenige Phagen gelangen über die im *N.crassa* Myzel sehr zahlreichen Anastomosen in die benachbarten Pilzhypen. Obwohl bei dem gewählten Anzuchtverfahren das Pilzmyzel 24 Std. nach Injektion bereits bis zum Rand der Petrischale (Segment 4) gewachsen war, wurde aus den Daten deutlich, daß zu diesem Zeitpunkt noch ein erheblicher Prozentsatz der Phagen im Injektionsbereich vorhanden war. Außerdem war die Verteilung der Phagen im peripheren Bereich (Segmente 3+4) noch relativ gleichförmig. 48 Std. nach Injektion konnte dagegen festgestellt werden, daß ca. 60% aller, in Form von "plaque forming units" reisolierbaren Phagen in den Hyphenspitzen des Myzels akkumuliert waren. Zu diesem Zeitpunkt war hier die Bildung erster Konidiosporen festzustellen.

Tabelle 2:

Aus Mikrokulturen der *N.crassa* Mutante *tryp-1*, a in Form von "plaque forming units" (p.f.u.) 24 Std. nach Mikroinjektion reisolierte λ ptrp-Phagen. Angegeben ist jeweils der aus 2 unabhängigen voneinander durchgeführten Versuchen erhaltene prozentuale Mittelwert der p.f.u. Die Gesamtzahl der reisolierten p.f.u. betrug 4210. Der Titer des Phageninjektionslysats war 8×10^9 p.f.u./ml.

% p.f.u. im Segment:	1	2	3	4
Sektor ↓				
I	20,0	4,0	11,6	11,7
+/- G	4,0	0,8	3,1	4,3
II		2,3	15,0	19,5
+/- G		0,6	6,0	6,7
III		1,1	1,4	3,6
+/- G		0,9	0,7	1,8
IV		2,1	2,8	4,7
+/- G		1,7	1,4	0,9

Tabelle 3:

Wie Tabelle 2; jedoch Reisolierung der p.f.u.
(Gesamtzahl 30.200) nach 48 Std.

% p.f.u. im Segment:	1	2	3	4
Sektor ↓				
I	4,9	1,5	24,8	64,3
+/- 6	2,5	0,9	10,8	6,2
II		0	0,2	0,4
+/- 6		-	0,1	0,3
III		0	0	0
+/- 6		-	-	-
IV		0	0	6,4
+/- 6		-	-	5,5

1.7. Intrazelluläre Verteilung von λ -Phagen im Myzel von

N.crassa nach Mikroinjektion:

Nachdem gezeigt war, daß sich Phagen nach Mikroinjektion durch den Plasmastrom interzellulär im Pilzmyzel verteilen und nach 2 Tagen etwa 60% der injizierten, noch funktionsfähigen Phagenpartikel in den Hyphenspitzen nachzuweisen sind, wurde die Frage nach der intrazellulären Verteilung der Phagen, d.h. nach ihrer Verteilung in bestimmten Zellkompartimenten experimentell untersucht. Dazu wurden mit λ ptrp-Phagen injizierte Mikrokulturen des N.crassa-Stammes try-1, his-1, A aufgeschlossen und durch differentielle Zentrifugation (vgl. B.16.) in eine Cytoplasma-(C), Kern-(N) und Mitochondrien-Fraktion (M) aufgetrennt. Proben der einzelnen Fraktionen wurden ultrabeschallt (vgl. C.1.5.3.2.) und die Phagenpartikel anschließend in Form von p.f.u. durch Titration auf geeigneten Indikatorbakterien nachgewiesen.

Um eine für den Aufschluß genügende Myzelmenge zu erhalten, wurden die Kulturen nach Mikroinjektion 6 Tage bei 25° C im Brutraum bebrütet. Pro Platte konnten 0,5-0,8g Myzel gewonnen werden. Es wurde jeweils nur identisches Material aus einer Petrischale aufgeschlossen.

Tabelle 4:

Nachweis von "plaque forming units" (p.f.u.) in Cytoplasma-(C), Kern- (N) und Mitochondrien-Fraktion (M) des *N.crassa*-Stammes try-1, his-1, A 6 Tage nach Mikroinjektion von λ ptrp-Phagen. Angegeben ist jeweils der prozentuale Mittelwert aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Fraktion:	C	N	M
p.f.u. in %:	59,3	31,3	9,2
+/- 6 :	5,0	3,6	1,4

Die Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen sind in Tabelle 4 dargestellt. Es zeigte sich, daß nach 6 Tagen etwa 60% der intakten Phagenpartikel aus dem Cytoplasma (C) reisoliert werden können. Ca. 30% der Phagen waren in der Kernfraktion (N), die restlichen 10% in der Mitochondrienfraktion (M) nachzuweisen. Ohne zwischengeschaltete Ultrabeschallung konnte nur in Proben aus Fraktion C der Phagennachweis geführt werden, nicht jedoch in den Fraktionen N und M. Dies könnte bedeuten, daß die λ -Phagen 6 Tage nach Injektion entweder in die Kerne bzw. Mitochondrien eingedrungen waren oder aber an die Membranen dieser Zellorganellen sehr stark adsorbiert waren. Eine derartige Adsorption an der Kernmembran von Eukaryotenzellen ist für Adenoviren bereits elektronenmikroskopisch gezeigt (W. Franke; persönliche Mitteilung).

1.8. Quantitative Abschätzung der mittels Mikroinjektion
in Hyphenzellen von N.crassa injizierbaren Phagen-
lysatmenge:

Empirisch hat sich bei den durchgeführten Mikroinjektionen gezeigt, daß das jeweils injizierbare Phagenlysatsvolumen in starkem Maße vom Zustand der Pilzhyphe abhängig ist. Insbesondere spielten dabei der Durchmesser der Hyphenzellen sowie die Kontinuität des Plasmastromes eine entscheidende Rolle. Aufgrund dieser - trotz weitgehender Standardisierungsverfahren - nicht auszuschließenden Variabilität des biologischen Materials, war es nicht möglich, jeweils exakt zu bestimmende Volumina an Phagenlysats zu injizieren.

Um dennoch eine quantitative Vorstellung über die zu injizierenden Volumina zu erhalten, wurde folgendes Annäherungsverfahren angewandt:

Gemäß B.15.7. wurde 1 µl λ ptrp-Injektionslysats (vgl. B.15.4.1.), dessen Titer vorher bestimmt war, in die Injektionskanüle aufgesaugt (vgl. B.16.7.). Dann wurden 4 gemäß C.1.6. angezogene Mikrokulturen des N.c.-Stammes tryp-1, his-1, A je 1x injiziert und anschließend das noch in der Kanüle verbliebene Restlysats in 5 ml TMG-Puffer (vgl. B.3.3.) injiziert. 24 Stunden nach Injektion wurden die Myzelien einzeln abgeerntet und gemäß C.1.5.3.2. aufgeschlossen. Die injizierten Phagen wurden jeweils als p.f.u. durch Titration (vgl. B.9.4.) bestimmt. Ebenso wurde der Phagentiter im Restlysats ermittelt. Die Menge der injizierten Phagen ergibt sich dann als Differenz zwischen dem Volumen der Kanülenfüllung zu Beginn (1 µl) und dem für das Restlysats aus der

Phagenzahl ermittelten Volumen.

Die Ergebnisse (vgl. Tabelle 5) zeigten, daß die injizierbaren Phagenlysatsvolumina in einem Bereich zwischen ca. 0,001 und 0,01 μ l lagen. Rein numerisch erscheinen diese Werte zunächst sehr gering. Bei einem - unter den gegebenen Wachstumsbedingungen - durchschnittlichen Volumen von 31×10^{-6} μ l einer N.crassa-Hyphenzelle (Länge 100 μ m; $\varnothing$ 20 μ m) bedeutet dies jedoch den zusätzlichen Zellinhalt von 32-320 Zellen; d.h. pro Mikroinjektion konnte ein dem Zellinhalt von ca. 30-300 Zellen entsprechendes Volumen an Phagenlysats zusätzlich in das Pilzmyzel eingespritzt werden.

Tabelle 5:

Nachweis von λ ptrp-Phagen in Form von p.f.u. durch Reisolierung aus Myzel der N.crassa-Mutante tryp-1, his-1, A 24 Stunden nach Mikroinjektion. Quantitative Abschätzung des injizierten Phagenlysatsvolumens durch Korrelation mit der Anzahl der reisolierten p.f.u.

Angegeben sind die Werte aus 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (1; 2).

	Titer des Injektions- lysats (p.f.u./ μ l)	Anzahl der reisolierten p.f.u.		Entsprechendes Volumen Injektions- lysats in μ l	
		(1)	(2)	(1)	(2)
3×10^6		31100	17300	0,01	0,006
		2500	3000	0,0008	0,001
		8700	29400	0,003	0,01
		24500	30400	0,008	0,01
p.f.u. im Restlysats ($\times 10^6$):		2,68	2,57		

1.9. Zeitliche Abhängigkeit des Phagennachweises:

Aus den in C.1.8. dargestellten Problemen und Daten geht hervor, daß mit Hilfe der hier angewandten Technik der Mikroinjektion eine quantitative Beantwortung der Frage nach einer zeitlichen Abhängigkeit der Reisolierbarkeit intakter Phagenpartikel (p.f.u.) aus *N.crassa*-Myzel nicht möglich ist. Das Problem der zeitabhängigen Inaktivierung von Phagenpartikeln mußte deshalb auf eine qualitative Untersuchung beschränkt bleiben. In 2 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsserien wurden je 8 tryp-1, his-1, A Mikrokulturen mit λ ptrp-Phagen injiziert und danach bei 25° C im Brutraum gehalten. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Tagen wurde das gesamte Myzel abgenommen und gemäß C.1.5.3. auf Phagen in Form von p.f.u. untersucht. Bis einschließlich 7 Tage nach Mikroinjektion wiesen die Plattierungen intakte Phagenpartikel nach. 8 Tage nach Injektion konnten dagegen keine Phagen in Form von p.f.u. mehr reisoliert werden.

1.10. Phagennachweis in Konidiosporen:

Wie in C.1.6. bereits erwähnt, konnte bei dem für die Mikrokulturen gewählten Anzuchtverfahren nach ca. 2 Tagen die Bildung erster Konidiosporen am Rand der Petrischale beobachtet werden. Zudem war gezeigt worden (vgl. C.1.6.), daß 2 Tage nach Mikroinjektion ca. 60% der injizierten, noch funktionsfähigen λ -Phagen aus diesen peripheren Bereichen der Pilzkultur reisoliert werden konnten. Im Hinblick auf eine spätere Untersuchung der Phagenwirkung in den Eukaryotenzellen erschienen diese Ergebnisse umso

wichtiger, als die Verfügbarkeit von phagenbeinhaltenden Einzelzellen eine wichtige Voraussetzung dafür darstellt.

Es wurde deshalb überprüft, ob aus solchen Konidien intakte Phagenpartikel reisolierbar sind. Gemäß C.1.6. angezogene Kulturen des *N.crassa*-Stammes tryp-1, his-1, A wurden je 1x mit λ ptrp-Rohlysate (vgl. B.9.2.1. + B.9.2.2.1.) injiziert und dann 48 Std. bei 25° C im Brutraum bebrütet. Dann wurde das gesamte Myzel abgeerntet, die Konidien gewonnen (vgl. B.10.1.) und gezählt (vgl. B.10.2.). Die Konidiensuspension wurde abzentrifugiert, das Pellet in Nethelerbecher überführt und gemäß C.1.5.3.2. zum Phagen-nachweis weiterbehandelt.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dargestellt.

Tabelle 6:

Geerntete Konidien (insgesamt)	Titer des Injektions-lysats (p.f.u./ml)	Reisolierte p.f.u.	Verhältnis Konidien : p.f.u.
$7,5 \times 10^6$		160	46875 : 1
$7,0 \times 10^6$	9×10^7	72	97222 : 1
$8,0 \times 10^6$		94	85106 : 1
$\bar{x}: 7,5 \times 10^6$	9×10^7	109	68807 : 1

Die Daten zeigen, daß bereits 2 Tage nach Mikroinjektion Phagen in Konidiosporen nachzuweisen sind. Im Durchschnitt enthält zu diesem Zeitpunkt jede 70.000.ste Spore einen intakten Phagenpartikel. Unter Berücksichtigung der in Tabelle 5 (vgl. C.1.8.) erhobenen Befunde bezüglich des

pro Injektion maximal injizierbaren Lysatvolumens von 0,01 μ l, ergibt sich ferner, daß die Konidien zum untersuchten Zeitpunkt ca. 12% aller injizierten Phagen enthalten.

2. Phagenwirkung:

Mit der weitgehenden Bewältigung der technischen Probleme in Zusammenhang mit der Mikroinjektion von Neurospora-zellen waren die Voraussetzungen für weitergehende Untersuchungen zur Phagenwirkung im eukaryotischen Wirt geschaffen. Das Interesse galt dabei hauptsächlich der Beantwortung folgender Fragen: 1) Wirkt sich die Injektion prokaryotischen Materials in irgendeiner unspezifischen Weise (z.B. Keimungsrate, morphologische Änderungen etc.) auf die Neurosporzellen aus? und 2) Läßt sich eine spezifische Expression der übertragenen prokaryotischen Erbinformation phänotypisch und genotypisch nachweisen? Experimentelle Ansätze zur Lösung dieser Fragen sind im folgenden dargestellt.

2.1. Einfluß injizierter Bakteriophagen auf die Keimungsrate von N.crassa-Wildtypkonidien:

Mit Cellophanfolie (vgl. C.1.6.) bedeckte Sucrose Minimalplatten (vgl. B.2.2.7.) wurden gemäß B.15.8. mit N.crassa WT a inokuliert, gemäß C.1.6. sektoriert und an markierten Punkten innerhalb Sektor I mit CsCl-gereinigtem λ ptrp-Phagenlysate (vgl. B.9.3.) injiziert (vgl. C.1.4.). Drei Tage nach Injektion wurden Myzel und Konidien von Sektor I geerntet und auf Erlenmeyer-Weithalskolben (vgl. B.10.1.) mit Sucrose Minimalmedium (vgl. B.2.2.7.) übertragen.

Parallel wurde zur Kontrolle mit dem in Sektor III gewachsenen identischen, jedoch nicht injizierten Pilzmaterial ebenso verfahren. Nach 10 Tagen - vom Zeitpunkt der Injektion gerechnet - wurden die Konidien der Versuchs- und der Kontrollgruppe zum ersten Mal geerntet (vgl. B.10.2.) und zur Bestimmung der Keimungsrate plattiert (vgl. B.10.3.). Mit den restlichen Konidien wurden wiederum - wie oben - Kolben mit Sucrose-Minimalmedium inokuliert. Nach 38 bzw. 86 Tagen wurden deren Konidien geerntet und die Keimungsrate durch Plattierung bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Plattierungen sind in Tabelle 7 dargestellt. Sie zeigen, daß die Keimungsrate von Konidien aus phageninjiziertem Myzel gegenüber der nicht injizierten Kontrolle vermindert ist. Während 10 Tage nach Injektion der Unterschied in Bezug auf die Kontrolle erst ca. 10% beträgt, wird nach etwa 1 Monat bereits eine Differenz von ca. 40% erreicht, die dann jedoch bis zum untersuchten Zeitraum von 86 Tagen relativ konstant bleibt. Die während des geprüften Zeitraums ebenfalls ständig abnehmende Keimungsrate in der nichtinjizierten Kontrollgruppe dürfte auf das Alter der Konidien sowie auf Nährstoffmangel im verbrauchten Medium zurückzuführen sein.

Die deutliche Verminderung in der Keimungsrate von Konidien aus phageninjiziertem Myzel weist darauf hin, daß viröses Material eine unspezifische Hemmwirkung in *Neurospora* verursachen kann.

Tabelle 7:

Keimungsrate von *N.crassa* WT-Konidien aus mit λ ptrp-Lysat injiziertem Myzel (I) und jeweils identischem, nicht injiziertem Myzel (Kontrolle = K) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 2 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (1) bzw. (2).

	I	K	I	K	I	K
Zeitraum nach Injektion in Tagen:	10		38		86	
Konidien plattiert: (1)	1020	1020	900	900	900	900
(2)	1500	1500	1350	1350	1700	1700
Kolonien gefunden: (1)	924	991	428	653	279	437
(2)	1277	1434	686	1083	415	738
Keimungsrate in %: (1)	90	97	47	72	31	48
(2)	85	96	51	80	24	43
Keimungsrate in % von I gef. bez.auf K gef. = 100%:	(1) 93		65		64	
(2)	89		63		56	
MW:	91		64		60	
+/- G:	2,8		1,4		5,6	

2.2. Ausprägung bakterieller Erbinformation in *N.crassa* nach Mikroinjektion von λ -Phagen:

Nachdem gezeigt war, daß λ -Phagen mit Hilfe der Technik der Mikroinjektion in Zellen des Schimmelpilzes *N.crassa* eingebracht werden können und nach gewisser Zeit eine partielle, unspezifische Hemmwirkung auf die Pilzzellen ausüben, sollte nun geprüft werden, ob auch eine Ausprägung der mittels transduzierender Phagen übertragenen, spezifisch bakteriellen Erbinformation möglich ist. Ein Hinweis darauf wäre das Auftreten tryptophanprototropher Neurospora-Zellen nach Injektion von tryp-auxotrophen Stämmen mit λ ptrp-Phagen.

Für die Untersuchungen wurden Petrischalen mit supplementiertem Sucrose Minimalmedium (vgl. B.2.2.7.) gemäß B.15.8. mit den *N.crassa* Stämmen *tryp*-1 a, bzw. *ed*^r-29A (*tryp*-2) als Empfänger inokuliert. Als Spender bakterieller Erbinformation wurden CsCl-gereinigte (vgl. B.9.3.), sterile (vgl. B.9.7.) Lysate hochtransduzierender λ pt_{trp}-Phagen (Transduktionsrate ca. 1/10, vgl. B.9.5.3.) injiziert (vgl. C.1.4.). Die Injektion der Myzelkulturen erfolgte an vorher markierten Stellen. Anschließend wurde ein kleines Stück der Myzelkultur um den Injektionsort samt Agar in der Fläche von ca. 3x4mm mit einer sterilen Lanzettadel ausgeschnitten und auf Erlenmeyerkolben (vgl. B.10.1.) mit Sucrose-Minimalmedium übertragen. Derartig inokulierte Kolben wurden anschließend 1-10 Wochen im Brutraum bei 25° C weitergezüchtet. Die entstandenen Konidien wurden geerntet, auf GFS Minimalmedium ohne Tryptophan ausplattiert und die Platten nach 3-tägiger Bebrütung auf *tryp*⁺-Kolonien hin untersucht (vgl. B.17.2.+3.)

Insgesamt wurden 13 derartige Experimente (vgl. Tabelle 8) und ebenso viele Kontrollen durchgeführt. In den Kontrollen wurde 3 mal TMG-Puffer, 7 mal λ plac-Lysat und 3 mal λ WT-Lysat injiziert. Bei 6 der durchgeführten Experimente traten makroskopisch sichtbare *tryp*⁺-Konidien auf. Da jedoch bei einem Experiment (Injektion des *N.crassa*-Stammes *ed*^r-29A) sämtliche abisolierten Kolonien nicht nur tryptophan-, sondern auch Panthotensäure-prototroph waren, wurden nur 5 Versuche als erfolgreich gewertet. Die Erfolgsrate betrug damit 38,5%. Die *tryp*⁺-Kolonien traten dabei in einer Häufigkeit von 0,17 bis 0,8 pro 10⁷.

plattierte Konidien auf, wobei die Dauer der Weiterzucht der injizierten Myzelkultur eine gewisse Bedeutung haben dürfte. Da jedoch auf Grund der biologischen Gegebenheiten das injizierbare Phagenlysatsvolumen um den Faktor 10 schwanken kann (vgl. C.1.8.) ist dies mit der angewandten Methode der Phagenapplikation nicht sicher zu belegen. Spontane Reversion kann als Ursache für die Tryptophan-prototrophie ausgeschlossen werden, da die Reversionsrate des verwendeten tryp-1 Stammes als kleiner 2×10^{-9} bezüglich dieses Markers und für den tryp-2 Stamm (ed^R -29A) als kleiner 9×10^{-8} ermittelt wurde (vgl. B.17.1.). Bei den jeweils parallel zum Experiment mit identischem Myzelmaterial durchgeführten Kontrollinjektionen wurden nach Plattierung der Konidien in keinem Fall tryp⁺-Kolonien gefunden.

Tabelle 8:

Zusammenstellung der Versuche zur Expression bakterieller Erbinformation in *N.crassa* durch Mikroinjektion von λ trp-Phagenlysats (Titer des Injektionslysats 2×10^{10} p.f.u./ml).

N.crassa Empf.- stamm	Anzahl der Versuche d e	Dauer d. Weiter- zucht n. Injekt. in Wochen	Anzahl d. platt. Konidien/ Versuch $\times 10^7$	Anzahl d. tryp ⁺ - Kolonien	Rate d. tryp ⁺ - Kolonien $\times 10^{-7}$	Bezeich- nung d. tryp ⁺ - Kolonien
tryp-1 A	1 -	1	0,3	-		
	2 1	1,5	20	7	0,35	K ₁₋₇
	2 1	2	28	5	0,17	N ₁₋₅
	3 1	4	20	9	0,45	F ₁₋₉
	1 -	6	20	-		
	1 1	10	20	16	0,8	G ₁₋₁₆
ed^R -29A	2 1	4	10	1	0,2	E
(tryp-2)	1 -	5	2	-		

Anmerkung: 1) d = durchgeführt, e = erfolgreich.

2) Die erhaltenen tryp⁺-Kolonien waren gleichmäßig auf den Minimalplatten verteilt.

3. Versuche mit prokaryotischer DNS:

Nachdem die Injektion transduzierender Phagenpartikel in einigen Versuchen zur Ausprägung bakterieller Erbinformation, d.h. zur Ausbildung Tryptophan-prototropher Neurosporakolonien geführt hatte, sollte nun untersucht werden, ob ähnliche Ergebnisse auch durch Mikroinjektion von reiner prokaryotischer DNS erzielt werden können. Die DNS der oben verwendeten λ ptrp-Phagen erschien wegen ihres relativ großen Molekulargewichtes ($30,8 \times 10^6$ D) für Injektionsversuche wenig geeignet. Der zur Injektion erforderliche hohe Druck sowie die an der Kanülenspitze auftretenden Scherkräfte zerstören - wie Vorversuche gezeigt haben (vgl. C.3.2.) - derartig hochmolekulare DNS, so daß auf diese Art und Weise nur Bruchstücke der Phagen-DNS übertragen werden könnten. Es schien deshalb sinnvoll, DNS niedrigeren Molekulargewichtes - wie sie etwa Plasmide besitzen - für derartige Versuche zu verwenden. Zudem ist Plasmid-DNS auf Grund ihrer ringförmigen Konfiguration gegenüber dem Angriff von Scherkräften weniger empfindlich, als die normalerweise linear vorliegende Phagen-DNS. Andererseits war zu prüfen, ob nackte circuläre DNS überhaupt ein geeignetes Template zur Übertragung bakterieller Erbinformation auf Neurospora darstellt. Vorversuche mußten deshalb der Frage gelten, inwieweit sich Plasmid-DNS gegenüber dem Angriff Neurospora-eigener Nukleasen als widerstandsfähig erweist und ob eventuelle diesbezügliche Schwierigkeiten durch Einsatz Nuklease-defekter *N.crassa*-Mutanten (nuc^-) gemindert werden können.

3.1. Inkubation von λ dv-Plasmid-DNS mit Rohextrakt aus

N.crassa Myzel:

Bevor in vivo Versuche unternommen wurden, dienten zunächst in vitro Experimente mit λ dv-Plasmid-DNS (vgl. B.1.2.) zur Untersuchung dieser Fragestellungen. Die in circular, kovalent geschlossener Ringform vorliegende λ dv-Plasmid-DNS (ccc-bzw. supercoil-DNS) ist ein Abkömmling der λ -DNS und umfaßt ca. 1/7 des ursprünglichen λ -Genoms. Dieses Siebtel beinhaltet noch sämtliche für Replikation bzw. Rekombination essentiellen Gene (Matsubara und Kaiser, 1968). λ dv-DNS kann in monomerer, dimerer und trimerer Form aus infizierten E.coli Zellen gewonnen werden. Das Molekulargewicht liegt dementsprechend zwischen ca. $2,1 \times 10^6$ D (monomer) und ca. $6,3 \times 10^6$ D (trimer). Diese beiden DNS-Spezies wurden auch für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen verwendet.

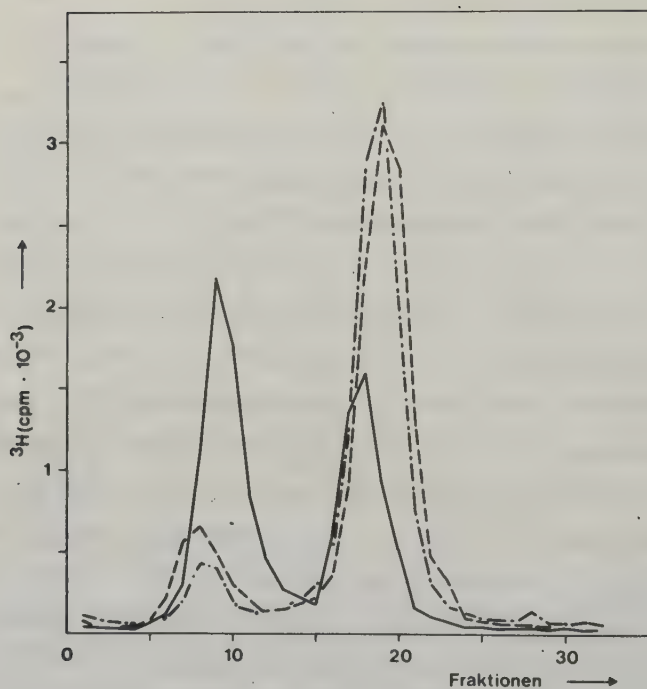
Besonders vorteilhaft für die Verwendung derartiger Plasmid-DNS erschien die Tatsache, daß nach einem Angriff von Endonukleasen der entstehende Einzelstrangbruch ("nick") zu einer Entspannung der ursprünglich in supercoil-Form vorliegenden DNS führt. Die entspannte Form (relaxed- bzw. oc-DNS) wiederum, an deren Bruchstelle nun Exonukleasen angreifen können, läßt sich über einen CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten relativ einfach von der ccc-Form abtrennen, da sie im Bereich geringerer Dichte bandiert.

Diese Tatsache wurde dazu benutzt, den Einfluß Neurospora-eigener Nukleasen aus Myzelrohextrakten auf derartige ccc-DNS zu testen. In den gemäß B.10.6. erhaltenen Rohextrakten verschiedener tryptophanauxotropher

N.crassa-Stämme (tryp-1 a, tryp-2 A, ed^r-29 A, tryp-3 A) und einer Nuklease-Doppelmutante nuc-1, nuc-2 (vgl. B.1.4.; Ishikawa et al., 1969; 1971) wurde zunächst die Gesamtproteinkonzentration (Lowry et al., 1951) ermittelt und anschließend durch eventuelle Pufferzugabe (vgl. B.3.2.) ein einheitlicher Konzentrationswert von 2,45mg/ml eingestellt, so daß jeweils Extrakte gleichen Proteingehaltes in den Versuchsreihen eingesetzt wurden. Dann wurden 20µl Tritium-markierte (³H)-λdv-DNS mit je 0,2ml Rohextrakt über verschiedene Zeiten (10-180 Min.) bei 25° C im Brutraum inkubiert. Die Inkubation wurde jeweils durch Zugabe von CsCl-Lösung gestoppt. Die Proben wurden anschließend gemäß B.11.7.1. im Dichtegradienten zentrifugiert. Zur Kontrolle des verwendeten DNS-Materials (Einzelstrangbrüche durch ³H-Zerfall) und als Bezugsgradient für die erhaltenen Versuchsdaten wurde pro Ansatz ein "0 Min." Gradient mitzentrifugiert. Dabei wurde sofort nach Zugabe der DNS zum N.crassa Rohextrakt die Inkubation durch CsCl-Lösung gestoppt. Weiterhin wurde bei Inkubationszeiten über 90 Min. parallel zu den Versuchsansätzen eine Pufferkontrolle durchgeführt. Dabei wurde anstelle des Rohextraktes jeweils die gleiche Menge Puffer (vgl. B.3.2.) mit λdv-DNS inkubiert.

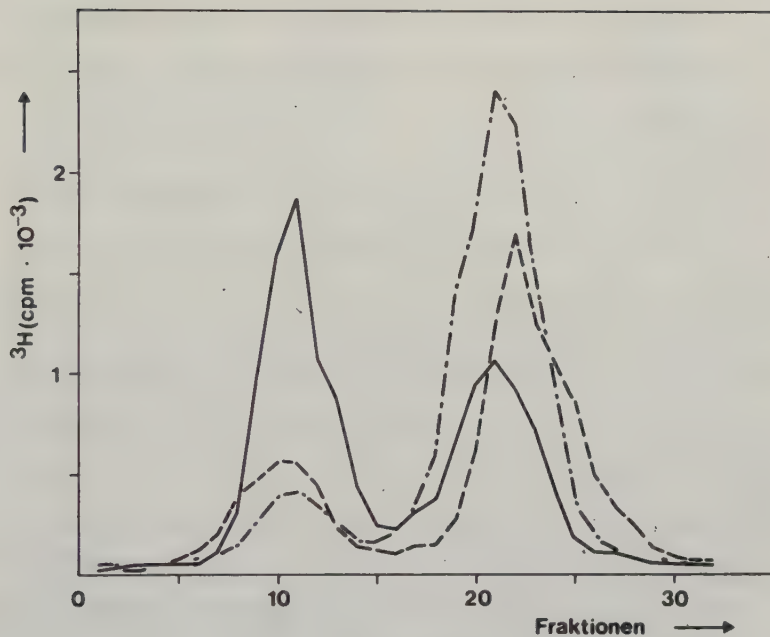
Charakteristische Ergebnisse nach Fraktionierung der Gradienten (vgl. B.12.) und Szintillationsmessung (vgl. B.4.) sind in den Abb. 7a und b dargestellt. Die erhobenen Daten zeigen, daß mit zunehmender Inkubationsdauer im Myzel-extrakt der N.crassa-Mutante tryp-1 a (Abb. 7a)

Abb. 7a:



Profil eines CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten nach
0- (—), 90- (----) und 180-minütiger (- · - · -)
Inkubation von λ dv-DNS mit Rohextrakt der *N.crassa*-
Mutante tryp-1 a.

Abb. 7b:



Profil eines CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten nach 0- (—), 90- (----) und 180-minütiger (— · —) Inkubation von λ dv-DNS mit Rohextrakt der *N.crassa*-Doppelmutante *nuc-1*, *nuc-2*.

Einzelstrangbrüche in der ccc-ldv-DNS auftreten, so daß der entsprechende Radioaktivitätspeak absinkt. Andererseits steigt die Radioaktivität im Peak der im Leichteren bandierenden oc-DNS entsprechend an. Die planimetrische Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in beiden Peaks hat ergeben, daß diese Entsprechung bis zu einer geprüften Inkubationsdauer von 240 Min. (o. Abb.) gilt. D.h. durch Endonukleaseaktivität im *Neurospora*-Extrakt "genickte" ccc-Plasmid-DNS-Moleküle bandieren dann im Peak der oc-Plasmid-DNS, dessen Radioaktivität dementsprechend zunimmt. An dieser oc-Plasmid-DNS konnte während des geprüften Zeitraumes mit der verwendeten Methodik kein weiterer Exonukleaseangriff nachgewiesen werden. Weder konnte eine Verbreiterung des oc-Peaks - dies hätte für das Auftreten von DNS-Bruchstücken gesprochen - beobachtet werden, noch war nach 90-minütiger Inkubation ein meßbarer Betrag an freien Nukleotiden im Inkubationsmedium nachweisbar. Um dies zu ermitteln, wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen parallel zur TCA-Präzipitierung (vgl. B.12.a)) auch durch Messung in Triton-PPO/POPOP (vgl. B.4.) bestimmt.

Die Befunde, die unter Verwendung von Rohextrakten der übrigen, oben genannten tryptophanauxotrophen *Neurospora*-stämme erhoben werden konnten, stimmten völlig mit den für den Stamm tryp-1 a ermittelten Daten überein, so daß sie hier nicht mehr eigens aufgeführt sind (vgl. auch Teles Grilo, 1976).

In Rohextrakten der Nuklease-Doppelmutante nuc-1, nuc-2 von *N.crassa* wurden - wie Abb. 7b zeigt - mit zunehmender Inkubationszeit dieselben Peak-Verschiebungen in der λ dv-DNS beobachtet, wie bei den tryptophanauxotrophen Stämmen. Bezüglich der Endo- und Exonukleaseaktivität konnte bei dieser Mutante im Vergleich zu Rohextrakten aus den übrigen geprüften Stämmen kein Unterschied festgestellt werden. Für das hier verfolgte Ziel bedeutete dies, daß ein eventuelles Einkreuzen der beiden Marker nuc-1 und nuc-2 in tryptophanauxotrophe *N.crassa*-Stämme keinerlei Vorteil für die Stabilität exogener DNS bedeuten würde und diese Mutante deshalb nicht mehr weiter untersucht wurde.

In den jeweiligen Pufferkontrollen bei Inkubationszeiten über 90 Min. konnte im Vergleich zu den 0-Min.-Werten während der untersuchten Zeiträume kein Abbau der ccc- λ dv-DNS gemessen werden. Die Kurvenverläufe zeigten keinerlei Unterschiede.

Zusammenfassend läßt sich aus den oben beschriebenen in vitro-Experimenten entnehmen, daß ccc- λ dv-DNS mit zunehmender Inkubationsdauer in Rohextrakten der geprüften *Neurospora*-Stämme durch Endonukleaseangriff Einzelstrangbrüche erleidet und in die entspannte, ringoffene Form (oc-DNS) übergeführt wird. Die oc-DNS ihrerseits scheint gegenüber Exonukleasen relativ stabil. Zumindest konnte nach bis zu 240-minütiger Inkubation im gewählten System kein diesbezüglicher Einfluß festgestellt werden (vgl. auch Teifel, 1976).

Auf Grund dieser relativen Stabilität erschienen weitere Versuche in Richtung einer eventuellen Expression prokaryotischer DNS in Neurospora als sinnvoll. Für die hier durchzuführenden Untersuchungen bedeutete dies, daß in anschließenden in vivo Experimenten versucht werden sollte, Plasmid-DNS in Hyphenzellen von *N.crassa* zu injizieren.

3.2. Mikroinjektion von λ dv-Plasmid-DNS:

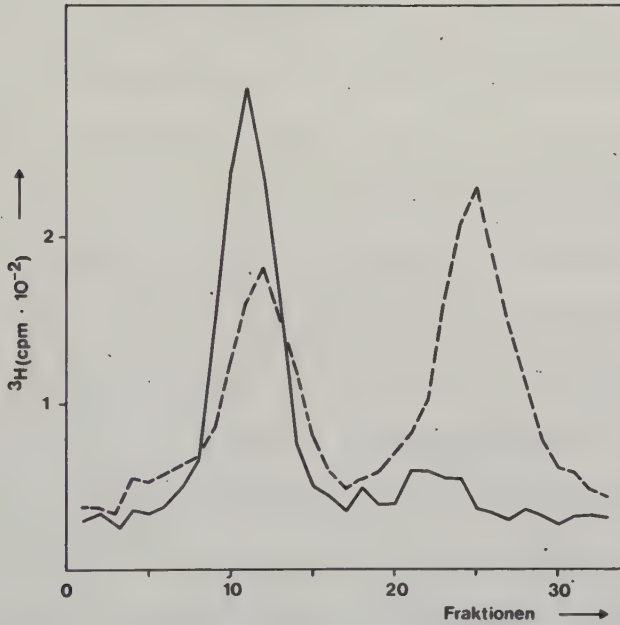
Für Mikroinjektionsexperimente wurde hochmarkierte ^3H - λ dv-DNS (monomer; MG $2,1 \times 10^6$ D; vgl. B.1.2.) eingesetzt. Bevor in vivo-Versuche durchgeführt werden konnten, mußte jedoch geprüft werden, inwieweit die verwendete Plasmid-DNS für derartige Mikroinjektionsexperimente geeignet ist.

3.2.1. Stabilität der Plasmid-DNS bei Mikroinjektion:

Wie in C.3. bereits erwähnt, wird der makromolekulare Aufbau der λ ptrp-DNS bei der Mikroinjektion weitgehend zerstört. Dafür sind vor allem die während der Ejektion aus der Mikrokanüle auftretenden Scherkräfte verantwortlich. Es wurde deshalb zuerst geprüft, inwieweit auch ringförmig-geschlossene Plasmid-DNS diesen Einflüssen unterliegt.

Dazu wurde λ dv-DNS aus einer gemäß B.15.4.2. erstellten Injektionslösung zur Kontrolle direkt auf einen CsCl-EtBr-Gradienten (vgl. B.11.7.1.) aufpipettiert. Zum anderen wurde aus derselben Injektionslösung eine Mikroinjektionskanüle gefüllt (vgl. B.15.5.) und die Lösung über die Mikroinjektionsapparatur (vgl. B.15.6.) in einen zweiten Gradienten (s.o.) eingespritzt. Anschließend wurden beide

Abb. 8:



Profil eines CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten von λ dv-DNS vor (—) und nach (-----) Ejektion aus der Mikroinjektionskanüle.

Gradienten gemeinsam zentrifugiert.

Die Auswertung (vgl. B.12.) dieser Gradienten ist in Abb. 8 dargestellt. Nach Ejektion der λ dv-Plasmid-DNS aus der Mikrokanüle wird die ursprünglich zu ca. 95% als ccc-DNS (=Kontrolle —) vorliegende Plasmid-DNS zum Teil gesichert, so daß etwa 60% der eingebrachten Plasmid-DNS "genickt" wird und in die oc-Form übergeht (-----). Wichtig ist jedoch festzustellen, daß trotz der für Mikroinjektionszwecke nötigen rigiden Behandlung des DNS-Materials unter den angewandten Bedingungen noch ca. 40% der Plasmid-DNS in Form der ccc-DNS ejiziert werden können. Zudem tritt - wie die Abbildungen zeigen - kein bemerkenswerter Anteil an kleineren DNS-Bruchstücken auf. Dieses Ergebnis zeigt, daß es mit Hilfe der Technik der Mikroinjektion möglich ist, Plasmid-DNS - im Gegensatz zur höhermolekularen, linearen Phagen-DNS - in einem relativ nativen Zustand zu übertragen und in entsprechenden in vivo Experimenten einzusetzen.

3.2.2. Versuche zur Mikroinjektion und Reisolierung injizierter ^3H - λ dv-DNS aus Neurosporaellen:

In vivo Mikroinjektionsexperimente mit λ dv-Plasmid-DNS sollten vor allem unternommen werden, um folgende Fragen näher zu klären: 1. Inwieweit und wie rasch erfolgt ein Abbau der injizierten Fremd-DNS? 2. Gelangt die DNS nach Injektion präferentiell in bestimmte Zellkompartimente (Kerne, Mitochondrien, Cytoplasma) des Wirtes?

Zur Prüfung der 1. Frage sollte die radioaktiv markierte Plasmid-DNS nach Injektion aus dem Neurosporamyzel

reisoliert und über einen CsCl-EtBr-Dichtegradienten identifiziert werden. Dazu wurde auf Nährmedienplatten (vgl. B.2.2.7.) gezogenes Myzel des *N.crassa*-Stammes tryp-1 a mit ^3H - λ dv-Plasmid-DNS (ca. 3000cpm/ μ l; ca. 225 μ g/ml) an markierten Stellen injiziert, der injizierte Myzelast anschließend exzidiert (vgl. B.17.2.) und in Flüssigmedium (vgl. B.2.2.7.) bei 25° C im Brutraum 48 Std. weitergezüchtet, um genügend Material für die DNS-Präparation zu erhalten. Dann wurde das gewachsene Myzel abgenutscht und zur Gewinnung der gesamten DNS entsprechend B.11.4. aufgearbeitet. Der DNS-haltige Überstand aus diesen Präparationen wurde anschließend im CsCl-EtBr-Gradienten (vgl. B.11.7.1.; $\rho = 1,6\text{gcm}^{-3}$) zentrifugiert, um die Plasmid-DNS abzutrennen. ^{14}C -markierte *N.crassa*-DNS wurde zur Kontrolle jeweils mitzentrifugiert.

Sämtliche der insgesamt drei, unabhängig voneinander durchgeführten Experimente verliefen jedoch negativ. Nach Auswertung der Gradienten und Szintillationsmessung (vgl. B.12.) konnte in keinem Fall ein über dem Background liegender ^3H -Radioaktivitätspeak ermittelt werden.

Auch in der *Neurospora*-DNS-Bande war kein meßbarer Anteil an ^3H -Aktivität enthalten, wie es bei einem Abbau der exogenen DNS und anschließendem Einbau der Nukleotide ins Wirtsgenom zu erwarten gewesen wäre.

Die Ursache für diese negativen Ergebnisse - die ebenfalls bei der experimentellen Prüfung der zweiten, obgenannten Frage zu verzeichnen waren - dürfte vor allem in der

nur geringen, mittels Mikroinjektion übertragbaren DNS-Menge (vgl. C.1.8.) zu suchen sein. Obwohl jeder untersuchte und weitergezüchtete Myzelbereich 3-4 mal mit λ dv-DNS injiziert wurde, konnten mit der angewandten Technik maximal ca. 120cpm (vgl. C.1.8.) auf die Neurosporaellen übertragen werden. Durch den unumgänglichen Materialverlust bei der DNS-Präparation dürfte sich dieser meßbare radioaktive Anteil noch weiter verringert haben. Da eine höhere radioaktive Markierung der λ dv-DNS ebenfalls nicht möglich war, erschien eine weitere Fortführung derartiger Versuche nicht sinnvoll, zumal diese Plasmid-DNS keinen genetischen Marker enthielt, der - wie im Fall des transduzierenden Phagen λ ptrp - auf biologische Wirkung hin hätte untersucht werden können.

3.3. Mikroinjektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS:

Eine derartige Möglichkeit zur Untersuchung eventueller biologischer Expressivität im eukaryotischen Wirt *N.crassa* ist jedoch mit einer anderen Plasmid-DNS, nämlich der des colicinogenen Faktors Col E 1-trp gegeben. Diese Plasmid-DNS (MG ca. $4,2 \times 10^6$ D), die - entsprechend λ dv - ebenfalls in einer ccc-Form gewonnen werden kann, enthält das gesamte Tryptophan-Operon von *E.coli* (Hershfield et al., 1974) und entspricht hierin dem in früheren Experimenten eingesetzten Phagen λ ptrp (vgl. C.2.2.).

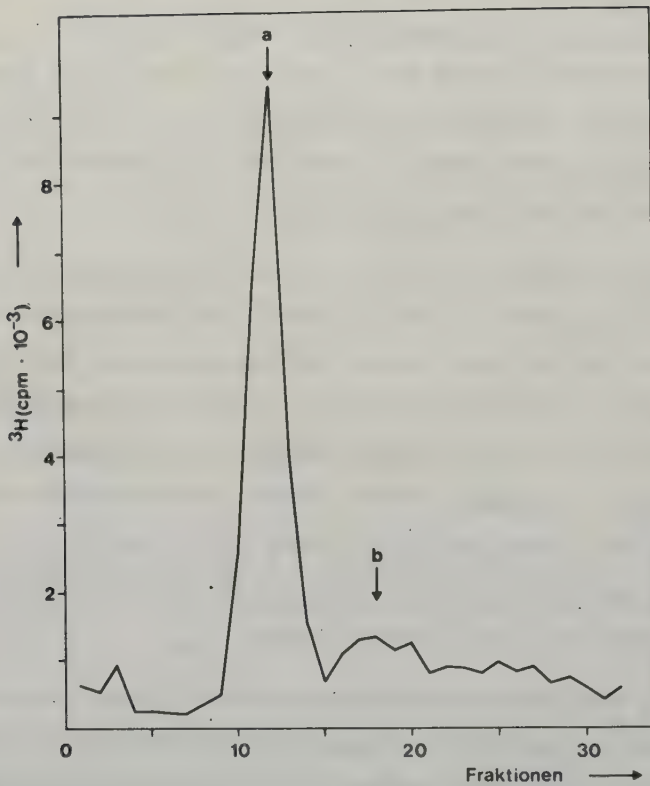
Um die geeignetste Methode zur Gewinnung von ccc-Col E 1-trp-DNS zu erarbeiten, wurden geprüfte Einzelkolonien (vgl. B.14.) des Bakterienstammes JMB 9, der dieses Plasmid enthält (vgl. B.1.3.) unter verschiedenen Bedingungen

angezüchtet (Schieß, 1974), die DNS radioaktiv markiert (vgl. B.11.2.) und nach anschließendem Aufschluß der Bakterienzellen über CsCl-EtBr-Gradienten gereinigt. Die in B.11.1. beschriebene Darstellungsmethode für diese Plasmid-DNS hat sich dabei am besten bewährt (F. Cannon; A. Pühler; persönliche Mitteilung) und wurde deshalb im folgenden ausschließlich angewandt. Die Auswertung der Gradienten erfolgte gemäß B.12.a) bzw. d).

Wie Abb. 9 zeigt, ist es mit dieser Methode möglich, die ccc-Plasmid-DNS in einer deutlich von den übrigen DNS-Formen (oc-DNS bzw. Bakterien-DNS) getrennten Bande zu erhalten, die zudem eine hohe DNS-Konzentration aufweist. Konzentrationsbestimmungen gemäß B.11.6. haben Werte zwischen 300-440 µg DNS/ml ergeben. Dies bedeutete hinsichtlich der später durchzuführenden Mikroinjektionsexperimente eine erhebliche Verbesserung, da ja nur sehr geringe Volumina injiziert werden können.

Bevor die nach B.12.d) erhaltene Col E 1-trp-Plasmid-DNS jedoch in Mikroinjektionsexperimenten eingesetzt wurde, erfolgte noch eine Überprüfung ihrer biologischen Funktionsfähigkeit. Dazu wurden gemäß B.13. Transformationsexperimente mit einem Tryptophan-auxotrophen E.coli-Stamm durchgeführt. Pro Experiment konnten dabei zwischen 20 und 29 transformierte E.coli-Kolonien/Platte gezählt werden. Dies entspricht einer Transformationsrate von ca. $2-3 \times 10^{-6}$. Sämtliche, parallel durchgeführten, identischen Kontrollen mit Col E 1-DNS (E.coli W 3110; vgl. B.1.3.) verliefen dabei negativ.

Abb. 9:



Profil eines CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten von
Col E 1-trp-Plasmid-DNS;

a) ccc-Plasmid-DNS,

b) oc-Plasmid-DNS und E.coli-DNS.

Weiterhin wurde vor Beginn der Mikroinjektionsexperimente anhand radioaktiv markierter ccc-Col E 1-tryp-Plasmid-DNS der Einfluß injektionsbedingter Scherkräfte auf diese DNS-Form analog zu C.3.2.1. überprüft. Die Ergebnisse dieser Unternehmungen waren identisch mit den dort für ccc- λ dv-DNS ermittelten, so daß auf eine eigene Darstellung an dieser Stelle verzichtet wurde. Ca. 60% der ccc-Col E 1-trp-DNS wurden auch hier bei Ejektion durch die Mikrokanüle "genickt" und in die oc-Form übergeführt.

Sämtliche Mikroinjektionsexperimente wurden entsprechend C.2.2. mit unmarkierter, CsCl-gereinigter ccc-Col E 1-trp-Plasmid-DNS durchgeführt. Als Empfänger dienten dabei die *N.crassa*-Stämme tryp-1a bzw. tryp-1, his 1A. Nach Injektion wurden die injizierten Myzelien wiederum entsprechend C.2.2. weitergezüchtet. Insgesamt wurden 14 derartige Mikroinjektionsexperimente mit der gleichen Anzahl von Kontrollen durchgeführt. Sämtliche Kontrollinjektionen erfolgten mit ccc-Col E 1-Plasmid-DNS des *E.coli*-Stammes W 3110.

3.4. Gewinnung prototropher *N.crassa*-Kolonien nach Mikroinjektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS:

Um die Frage einer eventuellen Expression bakterieller Erbinformation in *N.crassa* nach Injektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS experimentell zu prüfen, wurden - wie analog in C.2.2. dargestellt - die Konidiosporen der injizierten Pilzmyzelien nach mehrwöchiger Zwischenbebrütung abgeerntet und auf Minimalmedium (vgl. B.2.2.7.) ausplattiert. Nach 3-tägiger Bebrütung bei 25° C wurden die Platten auf tryp⁺-Kolonien hin untersucht.

Tabelle 9:

Zusammenstellung der Versuche zur Expression prokaryotischer Erbinformation in *N.crassa* nach Mikroinjektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS.

N.crassa Empf.- Stamm	Anzahl der Versuche	Dauer d. Weiter- zucht n. Injekt.in Wochen	Anzahl d.platt. Konidien/ Versuch $\times 10^7$	Anzahl d. tryp ⁺ - Kolonien	Rate d. tryp ⁺ - Kolonien $\times 10^{-7}$	Bezeich. d.tryp ⁺ - Kolonien
tryp-1,	1 -	2	1	-		
his-1A	2 -	3	3	-		
	1 -	4	1	-		
	4 -	8	3,5	-		
	2 -	12	2	-		
	1 1	19	2,5	5	2	C ₁₋₅
tryp-1a	1 1	22	12	2	0,16	C ₆₋₇
	2 2	23	4	14	3,5	C ₈₋₂₁

Anmerkung: 1) d = durchgeführt, e = erfolgreich.

2) Die erhaltenen tryp⁺-Kolonien waren gleichmäßig auf den Minimalplatten verteilt.

Bei den 14 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten konnten in 4 Fällen insgesamt 21 tryp⁺-Kolonien abisoliert werden (vgl. Tabelle 9). Die Erfolgsrate betrug damit 28,6%. Im Vergleich zu den in Tabelle 8 für λ trp-Phagen erhobenen Daten ist auffällig, daß sämtliche positiven Befunde erst 4-5 Monate nach Injektion von Col E 1-trp-DNS zu verzeichnen waren. Dies deutet wiederum auf eine zeitliche Abhängigkeit der Expression prokaryotischer Erbinformation im eukaryotischen Wirt hin (vgl. C.2.2.) In den erfolgreich durchgeführten Experimenten traten die tryp⁺-Kolonien dabei in einer Häufigkeit von 0,16 bis 3,5 pro 10^7 plattierte Konidien auf.

Bei den jeweils parallel zum Experiment mit identischem Myzelmaterial durchgeführten Kontrollinjektionen wurden nach gleichdauernder Zwischenbebrütung und anschließender Plattierung der Konidien keine tryp^+ -Kolonien gefunden.

4. Charakterisierung der Tryptophan-prototrophen

N.crassa-Isolate:

Nach Mikroinjektion von λptrp -Phagen bzw. Col E 1-trp-Plasmid-DNS in Tryptophan-auxotrophe *Neurospora*-Myzelien wurden insgesamt 59 tryp^+ -Kolonien isoliert (vgl. Tabellen 8 und 9). Diese Isolate wurden im folgenden näher untersucht.

4.1. Stabilität der Tryptophan-prototrophen Isolate:

Um zu prüfen, ob die Tryptophanprototrophie der isolierten tryp^+ -Kolonien über mehrere vegetative Passagen erhalten bleibt oder ob es sich dabei nur um einen Kurzzeiteffekt handelt, wurden von den 59 Isolaten gemäß B.17.4. je 5 Subkulturen im zeitlichen Abstand von 7 Tagen angelegt. Jede dieser Subkulturen wurde durch Beimpfen von flüssigem Sucrose Minimalmedium +/-Tryptophan qualitativ auf ihre Tryptophanprototrophie hin getestet (vgl. B.10.4.). Es zeigte sich, daß 26 der erhaltenen tryp^+ -Isolate im Laufe der vegetativen Subkultivierung tryptophanbedürftig wurden (vgl. Tabelle 10). Diese Instabilität bezüglich der Tryptophanprototrophie trat bei 15 Isolaten bereits in der 1. Subkultur, bei 6 Isolaten in der 2., bei 2 Isolaten in der 3. und bei weiteren 2 Isolaten in der 4. Subkultur auf.

Tabelle 10:

Zusammenstellung der während der vegetativen Vermehrung instabilen tryp^+ -Isolate.

<u>Subkultur:</u> <u>Isolat</u> ↓	0	1	2	3	4	5
E	+	-	-			
G ₁	+	-	-			
G ₄	+	-	-			
G ₁₃	+	-	-			
G ₁₄	+	-	-			
G ₁₅	+	-	-			
G ₁₆	+	-	-			
C ₁	+	-	-			
C ₃	+	-	-			
C ₅	+	-	-			
C ₁₆	+	-	-			
C ₁₇	+	-	-			
C ₁₈	+	-	-			
C ₁₉	+	-	-			
C ₂₀	+	-	-			
C ₂₁	+	-	-			
G ₅	+	+	-	-		
G ₁₁	+	+	-	-		
F ₂	+	+	-	-		
F ₄	+	+	-	-		
F ₆	+	+	-	-		
F ₉	+	+	-	-		
F ₁	+	+	+	-	-	
N ₂	+	+	+	-	-	
F ₇	+	+	+	+	-	-
F ₈	+	+	+	+	-	-

Anmerkung: Als Subkultur 0 ist die isolierte tryp^+ -Kolonie bezeichnet.

+ = Wachstum auf Minimalmedium ohne Tryptophan

- = kein Wachstum auf Minimalmedium ohne Tryptophan

4.2. Prüfung der Tryptophanprototrophie in den vegetativen

Subkulturen der stabilen tryp⁺-Isolate durch differentielle Plattierung:

Die nach Mikroinjektion von λ trp-Phagen bzw. Col E 1-trp-Plasmid-DNS erhaltenen stabilen tryp⁺-Kolonien sind auf phänotypisch Tryptophan-prototrophe Konidien zurückzuführen. Da Konidiosporen durchschnittlich 2-3 Zellkerne besitzen, ist nun denkbar, daß der tryp⁺-Marker in den Konidien

- a) in allen Kernen integriert
- b) nur in einem Teil der Kerne integriert
- c) als Exosom in allen Kernen
- d) als Exosom in einem Teil der Kerne
- e) oder als extrachromosomaler Faktor (= Plasmid oder in den Mitochondrien) vorliegt.

In den Fällen a) und c) sollten sich alle vegetativen Zellen der Isolate als tryp⁺ erweisen (Homokaryon), in den Fällen b) und d) dagegen nur ein Teil der Zellen (Heterokaryon). In Fall e) sind beide Möglichkeiten denkbar.

Um zwischen Homokaryen und Heterokaryen unterscheiden zu können, wurden die Isolate auf Glycerol Complete Medium angezüchtet (= 1. Subkultur) und die Konidien anschließend in geeigneter Anzahl auf GFS Minimalmedium +/-Tryptophan ausplattiert (vgl. B.17.5.). Durch zusätzliche Überprüfung der 5. Subkultur und bei einigen Isolaten (G_{2,3,6-10,12}) auch der 10. Subkultur im Heterokaryontest (vgl. B.17.5.) sollte ermittelt werden, ob sich der Anteil

der tryp^+ -Zellen im Verlauf vegetativer Passagen verändert, d.h. eine positive bzw. negative Selektion des Tryptophanprototrophie bedingenden Markers stattfindet.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11a-11e dargestellt. Es zeigte sich, daß bei 2 der untersuchten 33 stabilen Isolate in der 1. bzw. 5. Subkultur +/-Tryptophan etwa die gleiche Anzahl Konidien auskeimte (vgl. Tabelle 11a). Diese Isolate wurden als homokaryotisch bezeichnet, obwohl nicht ausgeschlossen werden konnte, daß der tryp^+ -Marker auf einem extrachromosomalen Faktor lokalisiert ist. Bei 11 Isolaten (vgl. Tabelle 11b) konnten auf Minimalmedium ohne Tryptophan in der 1. und 5. Subkultur ca. 15-30% weniger Kolonien ermittelt werden als auf Medium mit Tryptophan. Auch bei diesen als heterokaryotisch bezeichneten Isolaten könnte der tryp^+ -Marker auf einem extrachromosomalen Faktor liegen. Diese Einschränkung gilt analog für die weiteren im folgenden dargestellten Ergebnisse.

Bei den übrigen 20 untersuchten Isolaten wurde sowohl eine positive wie eine negative Selektion des tryp^+ -Markers im Verlauf von 5 vegetativen Passagen beobachtet. Bei den in Tabelle 11c aufgeführten Isolaten kann die 5. Subkultur mit den oben gemachten Einschränkungen als homokaryotisch bezeichnet werden, während die 1. Subkultur dieser Isolate heterokaryotisch ist. Die positive Selektion des tryp^+ -Markers bei diesen Isolaten beträgt ca. 15-85%. Ebenfalls positiv wurde der tryp^+ -Marker in den Subkulturen der Isolate $G_{3,6,7,10,12}$ (vgl. Tabelle 11d) selektiert.

Wie die erhobenen Daten zeigen, sind diese Isolate jedoch in der 5. Subkultur weiterhin als heterokaryotisch zu bezeichnen. Die positive Selektion zwischen 1. und 5. Subkultur beträgt 10-50% (Ausnahme: G₇ 74%). Dagegen ist in der 5. Subkultur der Isolate C₄, K₄, N₄₊₅ gegenüber der 1. Subkultur eine negative Selektion des trypt⁺-Markers festzustellen (vgl. Tabelle 11e). In der 5. Subkultur, die als heterokaryotisch zu bezeichnen ist, beträgt diese negative Selektion ca. 20-85%.

Die Frage, ob diese Selektion des trypt⁺-Markers sich während weiterer vegetativer Passagen noch signifikant ändert, wurde am Beispiel der G-bezeichneten Isolate überprüft. Von diesen Isolaten wurden nochmals 5 Subkulturen angelegt und die 10. Subkultur ($\hat{=}$ Kultivierungszeitraum 70 Tage) wie oben (vgl. B.17.5.) plattiert. Die erhaltenen Daten (vgl. Tabellen 11a, c + d) deuten in keinem Fall auf eine weitere Selektion des trypt⁺-Markers hin. Der Anteil der trypt⁺-Kolonien differierte gegenüber den Ergebnissen der 5. Subkultur nur um 0-8% (Ausnahme: G₇ 25%).

Tabellen 11a - 11e:

Differentielle Plattierung von Subkulturen der stabilen trypt⁺-Isolate.

Tabelle 11a:

Homokaryen

Subkultur-Nr.: 1 5 10

Anzahl der
Konidien auf: M M+T M M+T M M+T

Isolat ↓							Rate d. trypt ⁺ -Kolonien in % in Subkultur-Nr.		
							1	5	10
F ₃	191	203	365	403	-	-	94	91	-
G ₂	196	205	232	253	385	411	96	92	93

Tabelle 11b:

Heterokaryen

Subkultur-Nr.: 1 5

Anzahl der
Konidien auf: M M+T M M+T

Isolat ↓					Rate d. trypt ⁺ -Kolonien in % in Subkultur-Nr.	
					1	5
F ₅	253	323	205	266	78	77
N ₁	479	656	468	651	85	74
N ₃	506	656	468	651	77	72
K ₁	413	476	487	626	86	77
K ₂	431	573	539	662	75	81
K ₃	410	496	452	564	82	80
K ₅	390	537	434	558	73	78
K ₆	466	664	443	605	70	73
K ₇	431	624	417	598	69	70
C ₂	165	262	136	190	63	71
C ₁₂	264	356	139	164	74	85

Tabelle 11c:

Positive Selektion des trypt⁺-Markers während vegetativer
Subkultivierung → Homokaryen.

Subkultur-Nr.: 1 5 10

Anzahl der
Kolonien auf: M M+T M M+T M M+T

Isolat ↓							Rate der trypt ⁺ -Kolonien in % in Subkultur-Nr.		
							1	5	10
G ₈	19	219	194	206	307	300	9	94	102
G ₉	16	273	169	184	238	258	6	92	92
C ₆	226	277	139	142	-	-	82	98	-
C ₇	180	249	163	155	-	-	72	105	-
C ₈	215	295	142	141	-	-	73	100	-
C ₉	124	368	117	119	-	-	34	98	-
C ₁₀	111	377	141	131	-	-	29	107	-
C ₁₁	94	292	134	132	-	-	32	101	-
C ₁₃	156	291	127	135	-	-	54	94	-
C ₁₄	203	306	206	176	-	-	66	117	-
C ₁₅	124	289	120	107	-	-	43	112	-

Tabelle 11d:

Positive Selektion des trypt⁺-Markers während vegetativer Subkultivierung → Heterokaryen

Subkultur-Nr.:	1		5		10				
Anzahl der Kolonien auf:	M	M+T	M	M+T	M	M+T			
Isolat ↓							Rate d. trypt ⁺ -Kolonien in % in Subkultur-Nr.		
							1	5	10
G ₃	37	192	92	209	120	241	19	44	50
G ₆	86	276	184	232	288	411	31	79	70
G ₇	16	289	179	224	143	258	6	80	55
G ₁₀	5	265	27	242	68	437	2	11	15
G ₁₂	141	273	226	305	409	496	52	74	82

Tabelle 11e:

Negative Selektion des trypt⁺-Markers während vegetativer Subkultivierung → Heterokaryen.

Subkultur-Nr.:	1		5					
Anzahl der Kolonien auf:	M	M+T	M	M+T				
Isolat ↓					Rate der trypt ⁺ -Kolonien in % in Subkultur-Nr.			
					1	5		
C ₄	225	406	30	131	55	23		
K ₄	434	435	427	553	100	77		
N ₄	598	635	29	620	92	5		
N ₅	371	485	77	558	76	14		

Anmerkung zu den Tabellen 11a-11c:

M+T = GFS Minimalmedium + 50µg Tryptophan/ml

M = GFS Minimalmedium ohne Tryptophan.

Im Bedarfsfall wurden die Medien mit 100µg Histidin/ml supplementiert.

4.3. Kreuzung der stabilen homokaryotischen tryp^+ -Isolate mit auxotrophen tryp-1 Mutanten:

Wie bereits in C.4.2. erwähnt, konnten bei den erhaltenen stabilen tryp^+ -Isolaten keine Aussagen darüber gemacht werden, ob der tryp^+ -bedingende Marker chromosomal integriert, exosomal oder extrachromosomal vorlag. Für die erhaltenen homokaryotischen tryp^+ -Kolonien (vgl. Tabelle 11a und 11c) wurde versucht, diese Frage durch Kreuzung mit auxotrophen tryp-1 Mutanten zu beantworten.

Um sicherzustellen, daß im Falle der erst während einiger vegetativer Passagen homokaryotisch gewordenen tryp^+ -Isolate (vgl. Tabelle 11c) reine Linien in die jeweilige Kreuzung eingebracht werden konnten, wurden diese Isolate zunächst mit der Mutante tryp-1 , his-1 A gekreuzt. Die reifen Ascosporen wurden auf Minimalmedium (+ Histidin) ohne Tryptophan ausplattiert. Nach dreitägiger Bebrütung wurden einzelne Kolonien isoliert (F_1 -Isolate; vgl. B.18.3.) und der Paarungstyp durch Kreuzung mit Wildtyp A bzw. a bestimmt (vgl. B.18.4.).

Bei den anschließenden Kreuzungen (vgl. B.18.1.) der homokaryotischen tryp^+ -Isolate bzw. deren F_1 -Isolate mit tryp-1 Mutanten (tryp-1a bzw. tryp-1 , his-1 A), wurden jeweils die tryp^+ -Isolate als protoperithezienbildende Partner benützt. Die Rate der tryp^+ -Sporen wurde durch differentielle Plattierung der Ascosporen auf GFS Minimalmedium +/-Tryptophan bestimmt (vgl. B.18.2.). In Tabelle 12 sind die Ergebnisse dieser Kreuzungen dargestellt. Während die Kreuzungen der Isolate F_3 und

F₁G₈ steril blieben, zeigten das Isolat G₂ sowie 6 der insgesamt 10 gekreuzten tryp⁺-F₁-Isolate bezüglich des tryp⁺-Markers eine 4:4 Aufspaltung. Ca. 50% (48-55%) der Sporen waren tryptophanprototroph. Dies deutet auf eine Integration des Markers hin, der die Prototrophie bedingt.

Bei den restlichen 4 tryp⁺-F₁-Isolaten wurde eine aberrante Transmission des tryp⁺-Markers beobachtet. Dabei war die Rate der tryp⁺-Sporen bei den Isolaten F₁C₁₀ und F₁C₁₁ kleiner als ca. 50%, bei den Isolaten F₁C₇ und F₁C₉ dagegen größer. Diese Befunde deuten auf ein exosomales oder extrachromosomales Vorliegen der tryp⁺-Information hin. Zur Prüfung dieser Frage wurden die betreffenden Isolate reziprok mit der Mutante tryp-1 (protoperithezienbildender Partner) gekreuzt und die Ascosporen wiederum differentiell auf GFS Minimalmedium +/-Tryptophan plattiert (vgl. B.18.1. und 18.2.). Dabei erwiesen sich bei allen 4 Isolaten ca. 50% (45-56%) der Nachkommen als tryptophanprototroph (vgl. Tabelle 13). Damit dürfte das Vorliegen eines extrachromosomal lokalisierten tryp⁺-Markers (Plasmid) auszuschließen sein, da in diesem Fall keine tryp⁺-Sporen auftreten sollten. Die Daten deuten deshalb vielmehr darauf hin, daß die tryp⁺-Information auf einem Exosom lokalisiert ist. Während Karyogamie und Meiose könnte dieses Exosom entweder als solches im Kreuzungsvorgang erhalten bleiben oder chromosomal integriert werden. In beiden Fällen wäre eine 4:4 Aufspaltung zu erwarten (Mishra und Tatum, 1973).

Tabelle 12:

Kreuzung der stabilen homokaryotischen tryp^+ -bzw. tryp^+-F_1 -Isolate mit auxotrophen $\text{tryp}-1$ Mutanten.

Anzahl der Kolonien auf:	M	M+T	
Isolat ↓	Rate der tryp^+ - Kolonien in %		
G_2	312	561	55
$F_1 G_9$	149	277	53
$F_1 C_6$	182	338	53
$F_1 C_7$	128	198	64
$F_1 C_8$	200	421	48
$F_1 C_9$	511	735	70
$F_1 C_{10}$	68	176	38
$F_1 C_{11}$	144	487	29
$F_1 C_{13}$	250	478	52
$F_1 C_{14}$	338	607	55
$F_1 C_{15}$	314	620	50

Tabelle 13:

Reziproke Kreuzung der aberrant aufspaltenden homokaryotischen tryp^+-F_1 -Isolate.

Anzahl der Konidien auf:	M	M+T	
Isolat ↓	Rate der tryp^+ - Kolonien in %		
$F_1 C_7$	185	340	54
$F_1 C_9$	51	113	45
$F_1 C_{10}$	146	266	55
$F_1 C_{11}$	292	522	56

Anmerkung zu den Tabellen 12 und 13:

M+T = GFS Minimalmedium + 50 μ g Tryptophan/ml,

M = GFS Minimalmedium ohne Tryptophan

Im Bedarfsfall waren die Medien mit 100 μ g Histidin/ml supplementiert.

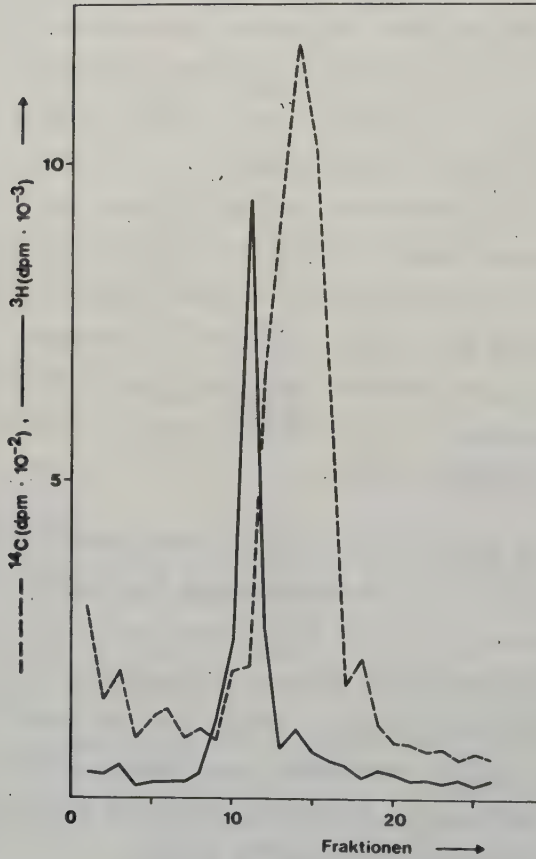
4.4. Untersuchung kreuzungssteriler, heterokaryotischer tryp⁺-Isolate durch Zentrifugation im CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten:

Um reine F₁-Linien zu erhalten, wurden auch die stabilen heterokaryotischen tryp⁺-Isolate mit auxotrophen tryp-1 Mutanten von *N.crassa* rückgekreuzt. Dabei erwiesen sich die beiden Isolate C₂ (tryp⁺, his⁻ A; vgl. Tabelle 11b) und C₄ (tryp⁺, his⁻ A; vgl. Tabelle 11e) als steril. Es konnten keine Ascosporen aus der Kreuzung mit der Mutante tryp-1a erhalten werden. Die reziproke Kreuzung (tryp-1a als protoperithezienbildender Partner) erwies sich dagegen in geringem Maß als fertil. Es wurden nur wenige Ascosporen gebildet. Bei einer Plattierung auf GFS Minimalmedium +/-Tryptophan (+Histidin) erwiesen sich diese Sporen insgesamt als tryp⁻.

Nachdem beide Isolate aber im Heterokaryontest bis zur 6. Subkultur (≙ Kultivierungszeitraum 42 Tage) Tryptophan-prototroph waren, schienen diese Daten auf das Vorliegen eines extrachromosomalen Faktors (=Plasmid) hinzudeuten. Falls dies zuträfe, wäre die Sterilität der oben genannten Kreuzungen nur durch einen unspezifischen Hemmeffekt der noch in Form eines Plasmids vorliegenden prokaryotischen Erbinformation zu deuten.

Im folgenden wurde deshalb versucht, diese Frage experimentell durch Zentrifugation der DNS dieser beiden Isolate im CsCl-EtBr Dichtegradienten zu klären. Vorversuche mit ¹⁴C-markierter *N.crassa*-DNS (Mutante tryp-1, his 1 A; vgl. B.11.4.) und ³H-markierter Col E 1-trp-Plasmid-DNS

Abb. 10a:



Lage von Col E 1-trp-Plasmid-DNS und *N.crassa*-DNS im neutralen CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten.

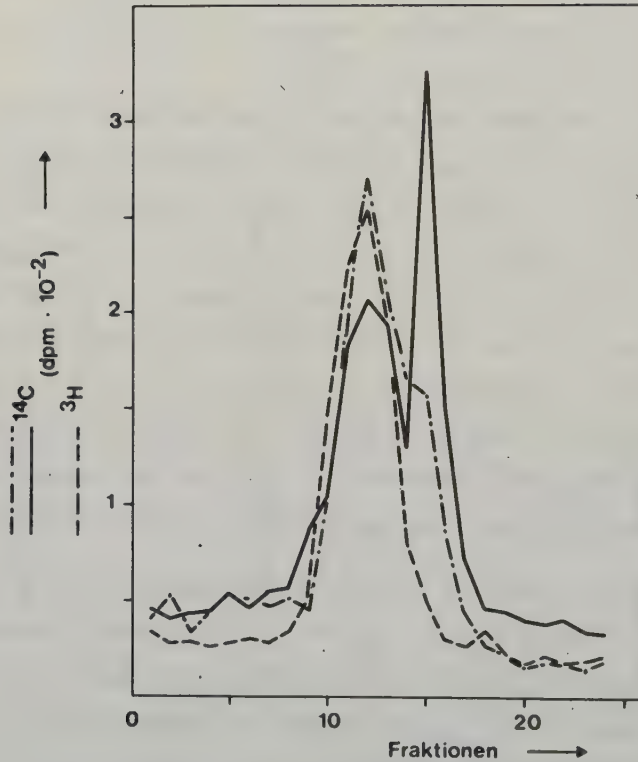
———— Col E 1-trp-Plasmid-DNS (^3H -markiert)
----- *N.crassa*-DNS (^{14}C -markiert)

(vgl. B.11.2.) haben gezeigt (Abb. 10a; Zentrifugationsbedingungen vgl. B.11.7.2.), daß eine Trennung beider DNS-Arten auf diese Weise möglich ist. Falls der tryp^+ -bedingende Marker in diesen Isolaten auf einem Plasmid lokalisiert sein sollte, müßte dies mit Hilfe dieser Technik also nachzuweisen sein.

Dazu wurden Myzelien beider Isolate (Subkultur 0) unter Zusatz von ^{14}C -Uridin angekeimt und die DNS jeweils gemäß B.11.4. isoliert. Der zunächst erhaltene DNS-haltige Überstand wurde dabei nochmal zentrifugiert (entsprechend Col E 1; vgl. B.11.1.), um den größten Teil der chromosomalen *N.crassa*-DNS zu entfernen. Der daraus erhaltene Überstand wurde dialysiert (vgl. B.11.4.) und anschließend gemäß B.11.7.2. zentrifugiert. Als interner Dichtemarker wurde jeweils ^3H -markierte Col E 1- trp -DNS zugegeben. Die Auswertung dieser Dichtegradienten erfolgte gemäß B.12.b).

Die Ergebnisse sind in Abb. 10b zusammengefaßt. Beide tryp^+ -Isolate (C_2 , C_4) weisen einen Radioaktivitätspeak im dichteren Bereich des Gradienten auf, der jeweils mit der Lage der Col E 1-DNS unter den gewählten Zentrifugationsbedingungen übereinstimmt. Isolat C_4 zeigt noch ein zweites Radioaktivitätsmaximum im leichteren Bereich, Isolat C_2 an derselben Stelle eine leichte Schulter in der Radioaktivitätsverteilung. Schulter wie Maximum müssen auf Grund der Lage im Gradienten chromosomaler *N.crassa*-DNS zugeordnet werden (vgl. Abb. 10a). Diese Befunde deuten - unter Berücksichtigung der Ergebnisse im Heterokaryontest (vgl. C.4.2.) - darauf hin, daß der die Tryptophanprototrophie bedingende Marker in beiden Isolaten auf einem Plasmid

Abb. 10b:



Profil der CsCl-Ethidiumbromid Dichtegradienten zweier
Tryptophan-prototropher *N.crassa*-Isolate nach Mikro-
injektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS.

- · - · - Isolat C₂ (¹⁴C-markiert)
- Isolat C₄ (¹⁴C-markiert)
- - - - Col E 1-trp-Plasmid-DNS (interner Marker,
³H-markiert)

lokalisiert ist. Dabei dürfte es sich um das ursprünglich injizierte Col E 1-trp-Plasmid handeln. Auf Grund der erhobenen Daten kann eine Replikation dieses Plasmids nach Mikroinjektion im eukaryotischen Wirt *N.crassa* nicht ausgeschlossen werden.

D.DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression prokaryotischer Erbinformation im eukaryotischen Schimmelpilz *Neurospora crassa* untersucht. Transduzierende λ -Phagen bzw. Plasmid-DNS des substituierten colicinogenen Faktors E 1 wurden als genetische Fremdinformation mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik auf die Neurosporazellen übertragen.

Nach Injektion und anschließender Reisolierung intakter Phagenpartikel konnte gezeigt werden, daß diese durch den Plasmastrom der Hyphenzellen im Pilzmyzel verteilt werden. 2 Tage nach Injektion waren so ca. 60% der als "plaque forming units" (p.f.u.) reisolierbaren Phagenpartikel in die Hyphenspitzen eingeschleußt (vgl. C.1.6.). 8 Tage nach Injektion konnten keine Phagen mehr in Form von p.f.u. nachgewiesen werden. Diese Inaktivierung könnte auf den Verlust des fragilen Phagenschwanzes oder auf einen enzymatischen Abbau der Phagenhülle zurückzuführen sein. Auch ein Verlust von DNS aus dem Phagenkopf könnte als Ursache dafür angenommen werden.

Um quantitative Daten über eine zeitabhängige Inaktivierung der Phagenpartikel in den für sie unspezifischen Wirtszellen zu erhalten, wurden identische Myzelien injiziert und täglich im Zeitraum von 1-8 Tagen aufgeschlossen und auf intakte Phagenpartikel (p.f.u.) hin untersucht. Hierbei ergaben sich jedoch große zahlenmäßige Schwankungen hinsichtlich der reisolierten p.f.u. Diese Schwankungen sind auf bestimmte biologische Variable in den zu injizierenden Pilzzellen zurückzuführen. Zwei Komponenten erwiesen sich

hauptsächlich entscheidend: 1) Ein kontinuierlich fließender Strom des Zellplasmas von Hyphenzelle zu Hyphenzelle, die durch Poren in den Zellsepten offen miteinander in Verbindung stehen (vgl. Abb. 4) und 2) das Verkleben dieser Poren durch bestimmte, diskrete Bestandteile ("Woronin bodies"; Buller, 1933) des Cytoplasmas. Wilson (1961) bezeichnete diesen Vorgang als "plug formation".

Durch die gewählten Anzuchtbedingungen für die zu injizierenden Mikrokulturen von *Neurospora crassa* konnte das in Punkt 1) genannte Problem gelöst werden. Obgleich bezüglich der Geschwindigkeit erhebliche Unterschiede (vgl. C.1.4.) zu beobachten waren, so war für eine erfolgreiche Injektion die Kontinuität des Plasmastromes entscheidend. Dies wurde weitgehend erreicht.

Was Punkt 2) betrifft, so konnte beobachtet werden, daß durch eine Störung dieser Kontinuität des Plasmastromes häufig die Poren in den Zellsepten verschlossen wurden. Dieser Effekt wurde entweder durch einen zu hohen Injektionsdruck und die dadurch bedingte Beschleunigung des Plasmastromes oder durch eine zu starke Verletzung der punktierten Zelle beim Injektionsvorgang ausgelöst. Der einmal unterbrochene Plasmastrom konnte meist nicht mehr regeneriert werden. Bestandteile des granulären Cytoplasmas dürften dafür verantwortlich sein. Diese Bestandteile, die normalerweise in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert sind (Wilson, 1961), "verkleben" die Zellporen zu den angrenzenden Hyphenzellen. Für den

wachsenden Pilz stellt dies eine Schutzfunktion dar. Bei Verletzung einer einzigen Zelle bleiben so alle übrigen Zellen intakt. Diese "Granulae" scheinen auch die Zellporen unverletzter Hyphenzellen, in denen kein Plasmastrom beobachtet wird, zu verkleben. Bei probeweiser Injektion derartiger Zellen konnte kein zusätzliches Injektionslysat in die Hyphen eingebracht werden. Dieses "Verkleben" der Zellporen ist trotz vorsichtigster Injektionstechnik nur schwer zu steuern. Manchmal tritt es wenige Sekunden nach Einstich der Kanüle auf, in anderen Fällen konnte die Injektionskanüle bis zu 15 Min. in der punktierten Zelle verbleiben und wieder zurückgezogen werden, ohne daß eine Störung des Plasmaflusses zu beobachten war. In dieser Tatsache - neben der begrenzten zusätzlichen Aufnahmekapazität - dürfte auch die Erklärung für die unterschiedlichen Injektionsmengen zu suchen sein, wodurch gleichzeitig die Schwankungen bezüglich der Zahl reisolierter Phagenpartikel erklärlich werden.

Innerhalb der aufeinanderfolgenden 7 Tage, in denen p.f.u. aus den Myzelien zurückgewonnen werden konnten, war dennoch bezüglich der Phagenzahl eine gewisse Tendenz festzustellen. Die Zahl der reisolierten Partikel nahm zunächst im Verlauf der ersten 5 Tage relativ rasch ab, und stieg dann bis zum 7. Tag wieder an, wobei ähnlich hohe Zahlenwerte erhalten wurden wie am 1. bzw. 2. Tag nach Injektion. Dies könnte - unter allen obengenannten Einschränkungen bezüglich des injizierten Lysatvolumens - auf eine Vermehrung von Phagenpartikeln in den Neurosporazellen hindeuten.

Berichte über die Vermehrung von Viren in eukaryotischen Wirtszellen liegen auch von anderen Autoren vor (Sander, 1967). Velikodvorskaya und Mitarbeiter (1972) berichteten über die Vermehrung eines DNS-Virus in *Penicillium*. Dieses Virus bildet auf einem Rasen von *E.coli*-Zellen Plaques. Die Konzentration konnte somit durch Titration bestimmt werden. Die Autoren fanden, daß nach 5-6 Tagen ein Maximum in der Zahl nachweisbarer p.f.u. auftritt, deren Zahl jedoch am 7. Tag rasch wieder abnimmt. Die Autoren erklären dies als Folge einer Degradation der Viruspartikel durch Autolyse der Pilzzellen. Im Inkubationsmedium konnten zu diesem Zeitpunkt aber keine intakten Viruspartikel nachgewiesen werden.

In Anbetracht der beinahe übereinstimmenden Tatsache, daß in der hier zu besprechenden Arbeit 8 Tage nach Injektion ebenfalls keine p.f.u. mehr nachgewiesen werden konnten, sollte die Frage einer eventuellen Vermehrung der Phagenpartikel weiter untersucht werden. Für eine Lösung dieses Problems scheinen zwei Wege gangbar: 1) Durch Injektion eines Gemisches zweier Phagenmutanten mit hoher Rekombinationsrate sollten im Falle einer Vermehrung einige Tage nach Injektion Rekombinantentypen reisolierbar sein. Voraussetzung ist allerdings eine minimale Reversionsrate der verwendeten Mutanten. Erste Voruntersuchungen in dieser Richtung wurden bereits begonnen. 2) Falls eine Phagenvermehrung stattfindet, sollten nach Injektion schweremarkierter Phagenpartikel (^{15}N ; D_2O) nach einigen Tagen "leichte" Partikel reisolierbar sein, die über einen CsCl -Dichtegradienten abgetrennt werden könnten. Vorteil gegenüber

Möglichkeit 1) ist dabei, daß hier kein zusätzlicher Rekombinationsprozeß erforderlich ist, um eine eventuelle Vermehrung nachzuweisen. Auch hier wurde bereits mit Voruntersuchungen begonnen.

Ein erster Hinweis auf eine Phagenwirkung in den Zellen von *Neurospora crassa* war durch die beobachtete, ca. 40%ige Verminderung der Keimungsrate von Konidiosporen aus injiziertem Wildtypmyzel gegenüber solchen aus identischem, nicht injiziertem Myzel (vgl. Tabelle 7) gegeben.

Eine derartige, unspezifische Hemmwirkung konnte ca. 1 Monat nach Injektion der Pilzzellen beobachtet werden. Als Ursache könnte die Bildung phagenspezifischer Genprodukte angenommen werden, die eine toxische Stoffwechselreaktion in den Zellen von *Neurospora* auslösen. Erste Hinweise darauf, daß bei interspezifischer Genübertragung mittels transduzierender Phagen nicht nur bakterielle, sondern auch die phageneigenen Gene abgelesen werden können, lieferten die DNS-RNS-Hybridisierungsversuche von Merrill und Mitarbeitern (1971). Eine zweite, mögliche Ursache für die verminderte Keimungsrate könnte auch in der unspezifischen Integration von Spender-DNS bzw. von Bruchstücken davon zu suchen sein, falls essentielle *Neurospora*-Gene dabei betroffen werden.

Voraussetzung für eine Expression bakterieller Gene im eukaryotischen Wirt ist, daß die übertragene Fremdinformation hochmolekular im unspezifischen "Milieu" erhalten bleibt. Da lineare λ ptp-DNS wegen ihres hohen Molekulargewichts für Injektionszwecke wenig geeignet ist (vgl. C.3.), wurde in Vorversuchen die Abbaurate von DNS-Spezies

geringeren Molekulargewichtes untersucht. In vitro Inkubationsversuche mit circulärer λ dv-Plasmid-DNS in Neurospora-Myzelextrakt sollten über die Stabilität der Fremd-DNS Aufschluß geben. Da circuläre DNS in zwei verschiedenen Molekülkonfigurationen vorliegen kann, nämlich einmal als ringförmig, kovalent geschlossenes Molekül (supercoil- bzw. ccc-DNS) und zum anderen in einer ringoffenen Konfiguration (oc-DNS), konnten zugleich Aussagen über die Stabilität dieser beiden DNS-Formen getroffen werden. Nach Zentrifugation der DNS im CsCl-EtBr-Dichtegradienten zeigte sich, daß mit zunehmender Inkubationszeit ein Abbau der ccc-DNS erfolgt. Die geschlossene DNS-Form geht dabei zunächst in eine entspannte, ringoffene ("relaxed"-) Konfiguration über (vgl. Abb. 7a und b).

Dies ist folgendermaßen zu erklären: In ccc-DNS-Molekülen gibt es Regionen, in denen keine oder nur schwache Wasserstoffverbindungen zwischen den beiden DNS-Einzelsträngen bestehen. In derartigen Regionen greifen einzelstrangspezifische Endonukleasen bevorzugt an (Kato et al., 1973; Beard et al., 1973; Wang, 1974). Solche Endonukleasen wurden auch in Myzelzellen von Neurospora nachgewiesen (Linn und Lehman, 1965). Führt der Angriff dieser Enzyme zu einem Bruch ("nick") in den DNS-Einzelsträngen, so entstehen entspannte Ringmoleküle. Dies konnte experimentell gezeigt werden. Nach 180-minütiger Inkubation im Myzelextrakt waren dadurch ca. 90% der eingebrachten ccc- λ dv-DNS in die oc-Form übergeführt. Ein weiterer Abbau dieser oc-DNS wurde dagegen im untersuchten Zeitraum nicht beobach-

tet. Dies könnte bedeuten, daß entspannte ringförmige DNS-Moleküle nicht oder kaum von Neurosporanukleasen angegriffen werden. Ähnliche Ergebnisse sind auch von Teifel (1976) bezüglich des Abbaus von "Hershey circles" - ebenfalls entspannter ringförmiger DNS-Moleküle - aus λ trp-DNS in Neurospora beschrieben.

Aufgrund der erhobenen Daten wurde in weiteren Experimenten zur interspezifischen Genübertragung die DNS des substituierten colicinogenen Faktors E 1-trp eingesetzt. Diese Plasmid-DNS, die - vergleichbar λ dv - ebenfalls in einer ccc-Form gewonnen werden kann, enthält das gesamte Tryptophan-Operon von E.coli (Hersfield et al., 1974) und entspricht hierin dem Bakteriophagen λ trp.

Nach Injektion Tryptophan-auxotropher Neurosporamyzelien mit λ trp-Phagen bzw. Col E 1-trp-Plasmid-DNS konnten in 9 von 27 Experimenten phänotypisch Tryptophan-prototrophe Kolonien isoliert werden. Das Auftreten derartiger Kolonien könnte u.a. auf folgende Ursachen zurückzuführen sein:

- 1) Spontane Reversion (echte Rückmutation des tryp-1 Markers oder kompensierende Suppressormutation);
- 2) Wildtypkontamination;
- 3) Expression der übertragenen prokaryotischen Gene nach
 - a) Integration der Spender-DNS oder von Bruchstücken davon an geeigneten Stellen im Empfänger genom,
 - b) exosomaler Assoziation der Spender-DNS ans Empfänger genom,
 - c) episomaler Stabilisierung der Spender-DNS in den Empfängerzellen.

Spontane Reversion scheidet als Ursache aus, da in den Experimenten nur tryp-1 Mutanten mit einer Reversionsrate kleiner 2×10^{-9} eingesetzt wurden, tryp⁺-Kolonien jedoch - wenn überhaupt - in einer Häufigkeit von $0,16-3,5 \times 10^7$ aufgetreten sind (vgl. Tabellen 8 und 9). Gegen eine induzierte Reversion spricht ferner die Tatsache, daß in den jeweils parallel durchgeführten Kontrollversuchen mit Puffer, λ plac- und Wildtyp-Phagen bzw. Col E 1-Plasmid-DNS keine tryp⁺-Kolonien isoliert werden konnten. Diese negativen Kontrollen sind ferner ein Hinweis darauf, daß Wildtypkontaminationen weitgehend ausgeschlossen werden können. Falls Suppressormutationen für den erhaltenen Effekt verantwortlich sind, sollten phänotypische tryp⁺-Kolonien auch in den entsprechenden Kontrollexperimenten auftreten. Dies konnte jedoch niemals beobachtet werden, obwohl die Kontrollen in gleicher Zahl, mit jeweils identischem Material und über den gleichen Zeitraum hinweg durchgeführt wurden.

Die relativ geringe Zahl der erhaltenen tryp⁺-Isolate könnte auch auf einen Abbau der injizierten Spendergenome durch Neurospora-eigene Nukleasen hindeuten. Dafür spricht die Tatsache, daß bezüglich der Zahl der Experimente die Erfolgsrate nach Injektion von Phagen geringfügig größer war als nach Injektion von Plasmid-DNS. Die Phagenhülle könnte hier einen anfänglichen Schutz für die Fremdinformation darstellen. Betrachtet man dagegen die Rate der erhaltenen tryp⁺-Kolonien pro 10^7 plattierte Konidien, so war die Erfolgsquote nach Injektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS höher (vgl. Tabellen 8 und 9). Denkbar wäre, daß die

Proteinhülle die DNS im unspezifischen Milieu zwar einerseits schützt, andererseits aber nur teilweise abgebaut wird, so daß DNS-Protein-Komplexe zurückbleiben, deren Information nicht exprimiert werden kann. Dafür sprächen auch Befunde von Horst und Mitarbeitern (1975). Die Autoren erzielten bei Inkubation mit λ plac-DNS bessere Erfolge (25%) an menschlichen Fibroblasten mit defekter β -Galaktosidase, als nach Behandlung mit λ plac-Phagen (15%). Es wäre also zu prüfen, inwieweit die Phagen-DNS im unspezifischen Milieu aus ihrer umgebenden Proteinhülle so freigesetzt wird, daß ein zumindest teilweise nativer Zustand erreicht ist. Durch Anwendung chemischer Agentien, die eine solche "Freisetzung" der DNS bewirken, könnte eventuell eine Steigerung der Erfolgsrate erreicht werden. So konnten Parkinson und Mitarbeiter (1971) zeigen, daß nach kurzzeitiger Zugabe von Na-Pyrophosphat die DNS aus dem Kopf von λ -Phagen relativ unversehrt austritt.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Erfolgsquoten sind auch verständlich, wenn man bedenkt, welche Bedingungen erfüllt sein müssen, damit bakterielle Gene in den Tryptophan-auxotrophen Neurospora-zellen exprimiert werden.

Zumindest Teile des biologisch aktiven Spendergenoms müssen in ein Empfänger-genom integriert sein oder aber derartig modifiziert werden, daß kein weiterer Abbau dieser Moleküle durch Neurospora-eigene Nukleasen erfolgt. Transkription und Translation der Fremdinformaiton müssen mit empfangereigenen Enzymen durchgeführt werden können. Die Genprodukte müssen dabei in genügender Konzentration gebildet werden und sich im unspezifischen Wirtsmilieu funktionstüchtig

erweisen. Ferner darf nicht außer acht gelassen werden, daß durch die angewandte Selektionsmethode nur Tryptophan-prototrophe Konidiosporen, aber keine Tryptophan-prototrophen Hyphenzellen erfaßt wurden.

Die nach den Experimenten durch interspezifische Genübertragung erhaltenen tryp^+ -Isolate konnten zunächst in stabile und instabile Isolate unterteilt werden. Von den 59 nach Mikroinjektion prokaryotischer Erbinformation erhaltenen tryp^+ -Kolonien erwiesen sich 26 Isolate als instabil. Im Laufe vegetativer Subkultivierung wurden diese Isolate wieder Tryptophan-bedürftig. Dies könnte man darauf zurückführen, daß die übertragenen bakteriellen Tryptophangene zwar für eine gewisse Zeit exprimiert, dann aber abgebaut und eliminiert wurden.

Eine mögliche Erklärung wäre das Exosomenmodell (Fox et al., 1970). Danach wären im vorliegenden Fall die prototrophiebedingenden, bakteriellen Gene nicht in die Linearstruktur des Neurosporen-genoms integriert, sondern nur mit homologen Chromosomenabschnitten assoziiert. Dabei könnten alternativ die Empfänger - oder die assoziierten Spendergene exprimiert werden, so daß neben prototrophen Zellen auch auxotrophe auftreten. Dafür spricht der meist heterokaryotische Charakter dieser Isolate. Mitotische Teilungsvorgänge könnten dann zur Eliminierung der Exosomen führen.

Falls die Spendergenome als extrakaryotische Faktoren im Plasma der Empfängerzellen vorliegen sollten und dort nicht repliziert, sondern nur transkribiert werden, wäre dies ebenfalls erklärbar. Mit zunehmendem Wachstum der Pilzzellen

würde dadurch ein Verdünnungseffekt eintreten, der zu einer Konzentrationsverminderung der entsprechenden Genprodukte führt. Dadurch wären auf Minimalmedium keine phänotypischen tryp^+ -Kolonien mehr nachweisbar.

Bei den erhaltenen 33 stabilen tryp^+ -Isolaten können unterschieden werden: Stabile homokaryotische Isolate (vgl. Tabelle 11a), stabile heterokaryotische Isolate mit positiver (vgl. Tabellen 11c und d) bzw. negativer (vgl. Tabelle 11e) Selektion des tryp^+ -Markers im Laufe vegetativer Subkultivierung auf Minimalmedium. Innerhalb der Isolate mit positiver Selektion muß noch zwischen solchen unterschieden werden, die sich nach 5 vegetativen Passagen im Heterokaryontest als homokaryotisch erwiesen (vgl. Tabelle 11c) und solchen, die weiterhin eine heterokaryotische Verteilung (vgl. Tabelle 11d) des tryp^+ -Markers zeigten, so daß lediglich die Rate der erhaltenen tryp^+ -Kolonien erhöht war.

Jede Tryptophan-prototrophe Kolonie ist auf eine phänotypisch Tryptophan-prototrophe Konidie zurückzuführen. Konidien besitzen bei *Neurospora* im Durchschnitt 2-3 Kerne. Enthalten nicht alle Kerne einer Konidie die tryp^+ -Information, so entstehen heterokaryotische Myzelien, die neben Tryptophan-prototrophen Sporen auch auxotrophe abschnüren. Derartig heterokaryotische Isolate sind von Szabó und Schablik (1975) auch nach Behandlung von inos^- -*Neurospora*-zellen mit *Neurospora*wildtyp-DNS beschrieben worden. Nach negativer Subkultivierung auf Minimalmedium stieg dabei der Anteil phänotypischer inos^+ -Zellen auf nahezu 50%. Dieser positive Selektionseffekt konnte bei 16 tryp^+ -Isolaten (vgl. Tabellen 11c und d) ebenfalls beobachtet werden.

Der Anteil der phänotypischen tryp^+ -Zellen erhöhte sich dabei teilweise (vgl. Tabelle 11c) bis zu 100%, d.h. alle Konidien enthielten Kerne mit tryp^+ -Information.

Nach Kreuzung der homokaryotischen tryp^+ -Isolate bzw. deren F_1 -Generation als protoperithezienbildende Partner mit dem entsprechenden Tryptophan-auxotrophen Ausgangsstamm konnte gezeigt werden, daß die phänotypisch stabil exprimierte tryp^+ -Information unterschiedlich transmittiert wird. Einige Isolate wiesen eine Mendelsche 4:4 Aufspaltung bezüglich des tryp^+ -Markers auf, andere Isolate dagegen eine aberrante Transmission dieses Markers (vgl. Tabelle 12).

In den Fällen, in denen eine 4:4 Aufspaltung nachgewiesen wurde, dürfte der tryp^+ -Marker stabil im Empfängergenom integriert sein. Dafür spricht auch die Tatsache, daß dieser Marker nach Kreuzung der F_1 -Generation stabil auf die F_2 -Nachkommen übertragen wurde (Ausnahme: Isolat $G_2 \hat{=} F_1$ -Generation). Wäre die tryp^+ -Information nicht integriert, so sollten unter den F_2 -Nachkommen auch solche auftreten, die eine aberrante Transmission dieses Markers aufweisen. Dies war - wie oben bereits angedeutet - auch bei 4 der geprüften Isolate der Fall. Unterschiedliche Keimungsraten der tryp^+ bzw. tryp^- Ascosporen könnten dafür verantwortlich sein. Andererseits wäre auch eine extrakaryotische Vererbung der Tryptophanprototrophie denkbar. Die reziproke Kreuzung unter Verwendung der tryp^+ -Isolate als männliche Partner ermöglicht hier eine nähere Klärung. Bei unterschiedlicher Keimungsrate sollte erneut eine anormale Aufspaltung festzustellen sein. Treten nur tryp^- -Sporen auf (0:8 Aufspaltung), so würde dies auf eine extrachromosomale Vererbung

hindeuten. Tatsächlich wurde bei den 4 diesbezüglich geprüften Isolaten (vgl. Tabelle 13) eine 4:4 Aufspaltung gefunden. Dies widerspricht zunächst einer cytoplasmatischen Vererbung des tryp^+ -Charakters. Eine mögliche Erklärung wäre die Lokalisation des tryp^+ -Markers auf einem Exosom. Dieses Exosom könnte entweder als solches im Kreuzungsvorgang erhalten bleiben oder chromosomal integriert werden. In beiden Fällen wäre eine 4:4 Aufspaltung zu erwarten. Für die Befunde hier würde dies bedeuten, daß aufgrund der anormalen Aufspaltung in der F_2 -Generation das Exosom noch nicht chromosomal integriert vorlag. Weiterhin ist daraus zu folgern, daß es vor Karyogamie und Meiose in Assoziierung mit dem Chromosom repliziert und erst in der anschließenden Rückkreuzung in das Neurosporagenom eingebaut wurde (Mishra und Tatum, 1973).

Ein derartiger Integrationsmechanismus wäre aber nicht nur im Falle einer exosomal assoziierten Erbinformation denkbar, sondern könnte ebenso durch den Einbau eines ursprünglich autonom replizierten Episoms erklärt werden. Dabei könnte die vegetative Stabilität der hier gekreuzten Elternstämme darauf beruhen, daß in den Neurosporazellen die Spender-DNS in ringförmigen Molekülen vorliegt und so vor einem nukleolytischen Abbau geschützt ist. So könnten intakte λ -DNS-Moleküle in den Neurosporazellen, ähnlich wie sonst in ihrem natürlichen Wirt E.coli, durch Paarung der homologen "sticky ends" und anschließende Verknüpfung der "nicks" durch wirtseigene Ligase in kovalent geschlossene Ringe übergeführt werden. Für die autonome Replikation der übertragenen bakteriellen Gene würde die Tatsache sprechen,

daß die heterokaryotische Parentalgeneration der hier gekreuzten Stämme eine positive Selektion des tryp^+ -Marker im Laufe vegetativer Passagen auf Minimalmedium aufwies.

Die Tatsache, daß Spender-DNS in Neurosporazellen episomal vorliegen kann, wurde von Mishra (1976) an transformierten inos^+ -Stämmen nachgewiesen. Der Autor konnte zeigen, daß nach Anwendung chemischer Agentien, die mit nicht chromosomal integrierter DNS interkalieren, Nachkommenzellen auftreten, denen die transformierte inos^+ -Information fehlt.

Da ein Episom innerhalb einer Empfängerzelle in zwei unterschiedlichen Zustandsformen vorliegen kann, nämlich einmal als autonomes DNS-Molekül und zum anderen in einer chromosomal integrierten Form, kann daraus auch eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Kreuzungsergebnisse abgeleitet werden. Die Annahme episomaler Spender-DNS-Moleküle konnte durch die Untersuchung zweier heterokaryotischer Isolate noch weiter gestützt werden (Isolat C_2 , Tabelle 11b und Isolat C_4 , Tabelle 11e). Als protoperithecienbildende Partner erwiesen sich beide Isolate in entsprechenden Kreuzungsexperimenten als steril. Reziproke Kreuzungen erbrachten nur sehr wenige sexuelle Nachkommen, die sämtliche tryp^- waren. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß diese Isolate dennoch vegetativ stabil und durch Injektion von Col E 1- trp -Plasmid-DNS erhalten waren, lag die Vermutung nahe, daß hier eine extrakaryotische Vererbung des tryp^+ -Charakters gegeben sein könnte. Ein Zusammenhang zwischen extrakaryotischen, mitochondrialen Faktoren und fehlender

Ausbildung von Protoperithezien ist bereits von Diacumakos et al. (1965) bei *Neurospora* beschrieben. Die Autoren konnten zeigen, daß nach Injektion mitochondrialer Fraktionen aus abnorm wachsenden inos^- -Neurosporzellen in normale inos^- -Hyphen keine Protoperithezien mehr ausgebildet wurden.

Da die oben genannten Isolate aus diesem Grund einer Kreuzungsgenetischen Analyse entzogen waren, wurde ihre DNS radioaktiv markiert und im CsCl-EtBr -Dichtegradienten analysiert. Als interner Dichtemarker wurde unterschiedlich markierte Col E 1-trp-DNS mitzentrifugiert. Nach Auswertung der Gradienten zeigte sich, daß beide Isolate einen Radioaktivitätspeak im dichteren Bereich des Gradienten aufwiesen. Ihre Lage war mit der der Col E 1-trp-DNS identisch. Dies bedeutet, daß der die Tryptophanprototrophie-bedingende Marker auf einem Plasmid lokalisiert sein muß. Dabei dürfte es sich um das ursprünglich injizierte Col E 1-trp-Plasmid handeln. Die vegetative Stabilität dieser Isolate deutet auf eine autonome Replikation dieses Plasmids hin.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Technik der Mikroinjektion wurde prokaryotische Erbinformation auf Zellen des eukaryotischen Schimmelpilzes *Neurospora crassa* übertragen. Funktionsfähigkeit und Verbleib dieser genetischen Fremdinformation wurden untersucht.

1. Zur Injektion wurden aus Glaskapillaren gezogene Mikrokanülen mit einem maximalen Spitzendurchmesser von $1\mu\text{m}$ verwendet. Die Verwendung derartig dünner Kanülen erforderte die Entwicklung neuer Verfahren in der Mikroinjektionstechnik.
2. Die Neurosporamyzelien wurden für Injektionszwecke in Form von Mikrokulturen angezüchtet. Dazu wurden spezielle Kulturbedingungen ausgearbeitet.
3. Nach Injektion transduzierender λ -Phagen konnten intakte Phagenpartikel in Form von "plaque forming units" (p.f.u.) aus den Pilzzellen reisoliert werden. Durch den Plasmastrom der Pilzzellen wurden die Phagen interzellulär im Myzel verteilt. Ca. 60% der reisolierbaren Phagen wurden 48 Std. nach Injektion in den Hyphenspitzen distal vom Injektionsort nachgewiesen.
4. Intakte Phagenpartikel konnten bis zu einem Zeitraum von 7 Tagen nach Mikroinjektion reisoliert und in Form von p.f.u. nachgewiesen werden.

5. Nach Injektion von Neurospora-Wildtypzellen mit λ ptrp-Phagen sinkt die Keimungsrate daraus erhaltener Konidiosporen gegenüber solchen aus nicht injiziertem, identischem Zellmaterial um ca. 40% ab.
6. Nach Mikroinjektion von trypt-1 Neurosporazellen mit λ ptrp Phagen traten bei 5 von 13 durchgeführten Experimenten Tryptophan-prototrophe Kolonien auf. Die entsprechenden Kontrollversuche waren negativ. Insgesamt wurden 38 trypt⁺-Isolate erhalten.
7. Bei "in vitro"-Inkubationsversuchen von λ dv-Plasmid-DNS in Neurospora-Rohextrakten konnte durch anschließende Zentrifugation der DNS im CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradienten kein meßbarer Abbau von oc-DNS durch Neurospora-eigene Nukleasen während des untersuchten Zeitraums (0-240 Min.) festgestellt werden.
8. Nach Mikroinjektion von Col E 1-trp-Plasmid-DNS in trypt-1 Neurosporazellen konnten aus 4 von insgesamt 14 durchgeführten Experimenten 21 trypt⁺-Kolonien isoliert werden. Entsprechende Kontrollinjektionen waren wiederum negativ.
9. Bei 26 der insgesamt erhaltenen Tryptophan-prototrophen Isolate ging der trypt⁺-Marker im Verlauf vegetativer Subkultivierung wieder verloren (instabile Isolate). Zwei der 33 stabilen trypt⁺-Isolate erwiesen sich bezüglich des trypt⁺-Markers als homokaryotisch, 31 Isolate als heterokaryotisch. Bei 20 dieser heterokaryotischen Isolate konnte im Verlauf der Subkultivierung eine positive bzw. negative Selektion des trypt⁺-Markers beobachtet werden.

10. Dreizehn tryp^+ -Isolate bzw. deren F_1 -Isolate wurden durch Kreuzungsanalyse näher charakterisiert. Bei 7 Isolaten konnte eine 4:4 Aufspaltung des tryp -Markers nachgewiesen werden, die übrigen zeigten eine aberrante Aufspaltung bzw. erwiesen sich als kreuzungssteril.
11. Bei zwei heterokaryotisch stabilen tryp^+ -Isolaten wurde die DNS radioaktiv (^{14}C) markiert, isoliert und im CsCl -Ethidiumbromid Dichtegradienten zentrifugiert. Die Radioaktivitätsverteilung zeigte in beiden Fällen ein übereinstimmendes Maximum mit ^3H -Col E 1-DNS, die als interner Dichtemarker mitzentrifugiert wurde. Der tryp^+ -Marker beider Isolate könnte deshalb auf einem autonom replizierten Plasmid lokalisiert sein.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmad, M., Khalil, M., Khan, N.A. & Mozmadar, A. (1964)
Structural and functional complexity at the tryp-1 locus
in *Neurospora crassa*
Genetics 49, 925-933
- Arroyo-Begovich, A. & De Moss, J.A. (1973)
The isolation of the components of the anthranilate
synthetase complex from *Neurospora crassa*
J. Biol. Chem. 248, 1262-1267
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., & McCarthy, M. (1944)
Studies on the chemical nature of the substance inducing
transformation of pneumococcal types
J. Exp. Med. 79, 137-158
- Beadle, G.W. & Tatum, E.L. (1941)
Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 27, 499-506
- Beard, P., Morrow, J.F. & Berg, P. (1973)
Cleavage of circular, superhelical Simian Virus 40 DNA
to a linear duplex by S_1 nuclease
J. Virol. 12, 1303-1313
- Buller, A.H.R. (1933)
Researches on fungi. Vol 5, part 1.
Longmans, Green & Co., New York, 1-167
- Brass, J.M. (1976)
Das hochaffine Glucose-Transport-System von *Neurospora crassa*
Dissertation Universität München
- Carlson, P.S. (1973)
The use of protoplasts for genetic research
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 598-602

Cocking, E.C. (1975)

Plant protoplasts in genetic systems

in: Genetic Manipulation with Plant Materials. NATO Advanced Study Institutes Series (edit. by Ledoux, L.)

Plenum Press New York and London, 311-327

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, C.L. (1972)

Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria:

Genetic transformation of *E.coli* by R-Factor DNA

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 2110-2114

Diacumakos, E.G., Garnjobst L. & Tatum E.L. (1965)

A cytoplasmic character in *Neurospora crassa*:

The role of nuclei and mitochondria

J. of Cell Biology 26, 427-443

Doy, C.H., Gresshoff, P.M. & Rolfe, B.G. (1973)

Biological and molecular evidence for the transgenesis of genes from Bacteria to plant cells

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 723-726

Fox, A.S. & Yoon, S.B. (1970)

DNA-induced transformation in *Drosophila*:

Locus-specificity and the establishment of transformed stocks

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 67, 1608-1615

Gaertner, F.H. & De Moss, J.A. (1969)

Purification and characterisation of a multienzyme complex in the tryptophan pathway of *Neurospora crassa*

J. Biol. Chem. 244, 2716-2725

Hershfield, V., Boyer, H.W., Yanofsky, Ch., Lovett, M.A. & Helsinki, D.R. (1974)

Plasmid Col E 1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 3455-3459

Hess, D. (1973)

Transformationsversuche an höheren Pflanzen: Untersuchungen zur Realisation des Exosomen-Modells der Transformation bei *Petunia hybrida*

Z. Pflanzenphysiol. 68, 432-440

Horowitz, N.H. (1947)

Methionine synthesis in *Neurospora*: The isolation of Cystathionine

J. Biol. Chem. 171, 255-264

Horst, J., Kluge, F., Bayreuther, K. & Gerok, W. (1975)

Gene transfer to human cells: Transducing λ plac gene expression in GM_T-gangliosidose fibroblasts

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 3531-3535

Hütter, R. & De Moss, J.A. (1967)

Organization of the Tryptophan pathway: a phylogenetic study of the fungi

J. Bacteriol. 94, 1896-1907

Ishikawa, T., Toh-E, A., Uno, I. & Hasunuma, K. (1969)

Isolation and characterization of nuclease mutants in *Neurospora crassa*

Genetics 63, 75-92

Ishikawa, T. & Hasunuma, K. (1971)

Properties of two nuclease genes in *Neurospora crassa*

Genetics 70, 371-384

Johnson, C.B., Grierson, D. & Smith, H. (1973)

Expression of λ plac 5 DNA in cultured cells of higher plant

Nature New Biol. 244, 105-106

Kato, A.C., Bartok, K., Fraser, M.J. & Denhardt, D.T. (1973)

Sensitivity of superhelical DNA to a single-strand specific endonuclease

Biochim. Biophys. Acta 308, 68-78

Kopac, M.J. (1955)

Recent developments in cellular micrurgy
Trans. New York Sci. Ser. II, 17, 257-265

Lederberg, J. & Tatum, E.L. (1946)

Gene recombination in E.coli
Nature 158, 558-564

Linn, S. & Lehmann, J.R. (1965)

An endonuclease from *Neurospora crassa* specific for
polynucleotides lacking on ordered structure
II. Studies of enzyme specifity
J. Biol. Chem. 240, 1294-1304

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275

Matsubara, K. & Kaiser, A.D. (1968)

λdv: an autonomously replicating DNA fragment
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 33, 768-775

Merril, C.R., Geier, M.R. & Petricciani, J.C. (1971)

Bacterial virus gene expression in human cells
Nature 233, 398-400

Merril, C.R. & Stanbro, H. (1974)

Intercellular gene transfer
Z. Pflanzenphysiol. 72, 371-388

Mishra, N.C. & Tatum, E.L. (1973)

Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol
independence in *Neurospora*
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 3875-3879

Mishra, N.C. (1976)

Episome-like behaviour of donor DNA in transformed strains
of *Neurospora crassa*
Nature 264, 251-253

Munkres, K.D., Munkres, M.N., Greene, P., Hedman, S.,
Andrews, B.J., Holland, G. & Woodward, D.O. (1966)
Isolation of subcellular fractions of *Neurospora mycelia*
Neurospora Newsletters 9, 14-15

Parkinson, J.S. & Huskey, R.J. (1971)
Deletion mutants of bacteriophage lambda
I. Isolation and initial characterization
J. Mol. Biol. 56, 369-384

Raab, W.P. (1972)
Natamycin (Pimaricin). Its properties and possibilities
in medicine
Georg Thieme Publishers Stuttgart

Sander, E.M. (1967)
Alteration of fd phage in tobacco leaves
Virology 33, 121-130

Schieß, W. (1974)
Untersuchungen zur Replikation, Transkription und
Translation des Colicinogenen Plasmids E 1
Dissertation Universität Hohenheim

Shimada, K., Weisberg, R.A. & Gottesmann, M.E. (1972)
Prophage lambda at unusual chromosomal locations.
I. Location of the secondary attachment sites and the
properties of the lysogens
J. Molec. Biol. 63, 483-503

Szabó, G. & Schablik, M. (1973)
DNA uptake by *Neurospora crassa*
Neurospora Newsletters 20, 27-28

Szabó, G. & Schablik, M. (1975)
Heterocaryosis in DNA-induced inositol-independent
hyphae of *Neurospora crassa*
Neurospora Newsletters 22, 11-12

Teifel, J. (1976)

Untersuchungen zur Expression prokaryotischer Erbinformation
im Schimmelpilz *Neurospora crassa*
Dissertation Universität München

Teles Grilo, M.L. (1975)

Über die Wirkung von Edein und mutativer Edeinresistenz
auf die genetische Rekombination bei *Neurospora crassa*
Dissertation Universität München

Velikodvorskaya, G.A., Bobkova, A.F., Maksimova, T.S.,
Klinenko, S.M. & Tikhonenko, T.I. (1972)

New viruses isolated from a culture of a fungus of the
genus *Penicillium*

Byulleten' Éksperimental'noi Biologii i Meditsiny 73, 90-93

Vinograd, J. (1963)

Sedimentation equilibrium in a buoyant density gradient
in *Methods in Enzymology* 6, Academic Press New York
and London, 854-871

Vogel, H.J. (1956)

A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N.)
Microbiol. Genet. Bull. 13, 42-43

Wang, J.C. (1974)

Interactions between twisted DNAs and enzymes:
The effect of superhelical turns
J. Molec. Biol. 87, 797-816

Westergaard, M. & Mitchell, H.K. (1947)

Neurospora.

V. A synthetic medium favouring sexual reproduction
Amer. J. Bot. 34, 573-577

Wilson, J.F. (1961)

Micrurgical techniques for *Neurospora*
Amer. J. Bot. 48, 46-51

Wittmann, I. (1973)

Methodische Studien zur Frage der intergenerischen
Transduktion

Zulassungsarbeit aus dem Genetischen Institut der
Universität München

Zettler, F. (1970)

Kalt gefüllte Mikrokapillaren und ihre elektrophysiologisch
relevanten Eigenschaften

Z. vergl. Physiol. 67, 423-435

Zinder, N.D. & Lederberg, J. (1952)

Genetic exchange in Salmonella

J. Bacteriol. 64, 679-699

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen herzlich danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Klingmüller für die Anregung zu dieser Arbeit, seine ständige großzügige Förderung und Diskussionsbereitschaft, sowie Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für seine Ratschläge und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit am Genetischen Institut der Universität.

Weiterhin danke ich

Herrn Dr. G. Hobom für die Bereitstellung von λ dv-Plasmid-DNS;

Herrn Dr. C. Yanofsky für die Überlassung des E.coli-Stammes JMB 9 (pVH 5);

Frl. G. Feldmeier für die in hervorragender Präzision hergestellten Mikroinjektionskanülen;

Herrn W. Strobel für die Hilfe und praktische Unterstützung bei vielen technischen Problemen;

Frl. D. Sell für die zeitweilige Assistenz bei der Durchführung von Versuchen;

Herrn S. Roser für seine Hilfe bei der Anfertigung der Zeichnungen;

den Firmen Wacker-Chemie und Kalle AG für die kostenlose Bereitstellung wichtiger Versuchsmaterialien.

Der Universität München gilt mein Dank für die Förderung dieser Arbeit durch die Bewilligung eines Graduiertenstipendiums.

